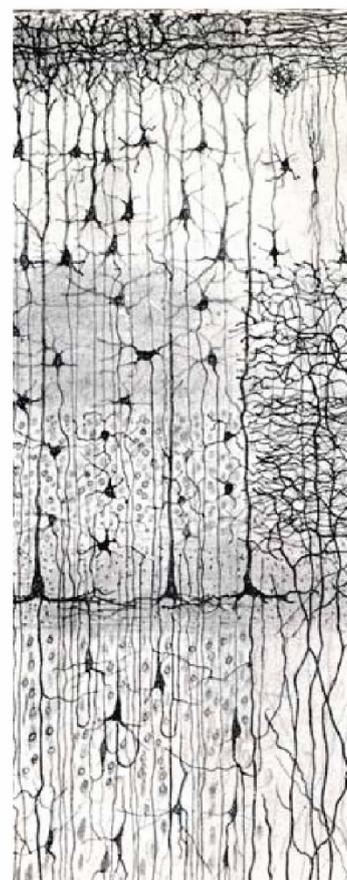
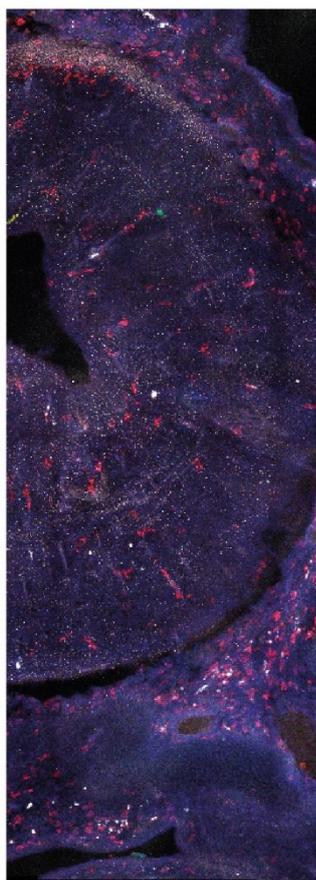
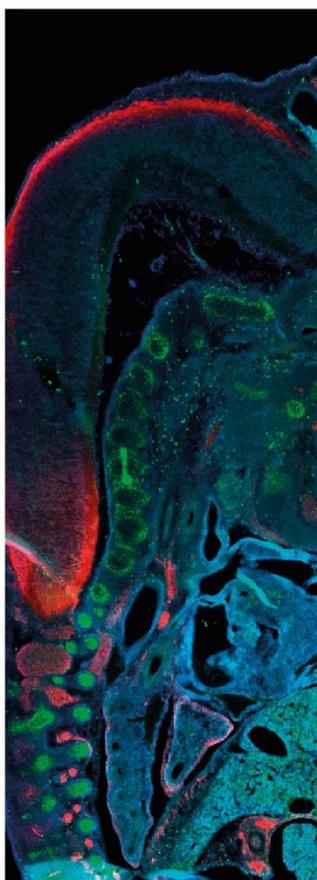


PAPELES NO APOTÓTICOS DE LAS CASPASAS EN LA
NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL Y EL DESARROLLO
EMBRIONARIO DE LA MICROGLÍA

ISABEL M ALONSO BELLIDO



**PAPELES NO APOPTÓTICOS DE LAS CASPASAS EN LA
NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL Y EL DESARROLLO EMBRIONARIO
DE LA MICROGLÍA**

Memoria presentada por Isabel María Alonso Bellido para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Sevilla

AGRADECIMIENTOS

No exagero si digo estas palabras que vais a leer aquí han sido la parte que más esfuerzo me ha supuesto y en la que más me he exigido. Los motivos son simples, yo soy la mezcla de muchas grandes personas que, a lo largo de mi vida me han ido sumando. Aunque suene a tópico decir que *“mi tesis no habría sido posible sin vuestra ayuda”* es la gran verdad. Y el segundo motivo, es mi eje central en la vida: agradecer y disfrutar de todo lo bueno que hay a mi alrededor.

Todo el mundo suele terminar agradeciendo a la familia...por eso de lo mejor para el final, pero a lo largo de mi tesis también he aprendido a priorizar, a poner primero lo verdaderamente importante y en mi caso, son ellos. La suerte de mi vida. Con ellos a mi lado siento que puedo con todos los problemas que me vengan en la vida.

De ellos he aprendido tantas y tantas cosas...puedo decir sin duda, que lo bueno que podáis ver en mí, es un reflejo de ellos. Han sido el ejemplo constante de entrega, de lucha, de superación, de unidad, de amor, de bondad...como yo les digo siempre, de luz. Una luz que es capaz de iluminarlo todo.

A ti **papá** por tus “vales”, por darme todo sin pedir nada a cambio, por ser ejemplo de esfuerzo incansable y constancia, por hacerme del Real Betis Balompié y porque con los años a pesar de tus pocas palabras ya he conseguido leer en tu cara lo orgulloso que estás de mí, y ese es mi mayor premio en la vida. Oye, eso sí, el día de la defensa de la tesis no me preguntes “¿y el 11?”. Te quiero con toda mi alma papá.

A ti **mamá**, mi vida entera. Tu sonrisa y tus abrazos son mi hogar, mi sitio feliz y seguro, mi fuerza y mi paz. Eres tan bonita y tan especial que sigo sin saber cómo tengo tanta suerte en la vida. Me sorprendió escucharte una vez decir que tú no habías podido ser ejemplo en los estudios y hoy aprovecho para decirte que sí lo has sido, no solo ejemplo, sino motor. Fuiste ejemplo y motor porque nos trasladaste tus ganas de aprender y tu curiosidad, nos motivaste a esforzarnos y a aprovechar la oportunidad que tú no pudiste tener, nos dejaste nuestro espacio de mejora y nos apoyaste a seguir luchando. Ver tus ganas fue mi mayor ejemplo. Si estás orgullosa de mí, es gracias a ti y a papá. Gracias por llenar mis vacíos existenciales con tus abrazos y sonrisas. Mis logros como hija, son los vuestros como padres. Te quiero con locura.

A ti **Antonio**, porque cuando te apetece hacer de hermano mayor lo haces muy bien. Sé que me quieres y estas orgulloso de mí, aunque te cueste admitirlo. Eso me ha hecho ser quien soy y exigirme por ser mejor cada día. A ti **Paula** por aguantar a mi hermano y por estar siempre dispuesta a escucharme y apoyarme. Más que cuñada, eres una hermana más. A ti **Ro**, por tu positividad contagiosa, tu alegría constante, tus locuras, nuestra complicidad, por ser mi apoyo

incondicional, mi hermana y mi amiga. A ti **José** por tu enorme corazón, por tu risa de Winnie the Pooh que tan feliz me hace, por tu apoyo y tu forma de ver la vida. A ti **Cristina** por ser ejemplo de constancia y superación, por tu entrega y generosidad. De ti he aprendido desde pequeña el orden, la disciplina y la lucha. A mis sobrinos, **Cristina, Alba, Jaime, Pitu** e **Inés**, porque cada uno a vuestra forma me enseñáis día a día a ser mejor. Ser la tita loca cabra montesa supone mucha presión y debo ser vuestro ejemplo...pero no dudo que me superaréis en todo. Estoy muy orgullosa de vosotros, de vuestra inteligencia, de vuestra alegría y madurez, y sobre todo...de que sigáis los pasos de esta familia de locos.

A ti **tito Pedro**, mi tito rata, mi segundo padre. Qué caprichoso el destino, toda la vida llamándome ratita y acabo trabajando con ellas...Te quiero mucho y tu sonrisa me hace más fuerte.

A ti **tita Basi**, mi segunda madre. Me dijiste que revisarías cada falta de ortografía de la tesis, pero al final la has hecho a mi lado y me has dado fuerza. Te siento cerca, te veo en todos lados y prometo seguir viéndote. En cada logro me suena tu voz repitiendo "la capa", hoy más que nunca sé que hubieras disfrutado conmigo. Fuiste ejemplo de fortaleza, de energía y quiero seguir tu huella. Maestra en la vida y maestra de vida.

A ti **abuela**, esto es en gran parte por ti. Te quiero y eso sé que no lo olvidaste.

Con permiso buenas tardes **Fausto**...yo pensaba que mi cupo de suerte ya lo tenía más que completo, pero llegaste tu y me sentí egoísta por acaparar aún más toda la suerte del mundo. Eres mi mejor amigo, mi compañero de vida, mi equipo favorito, eres un gol del Betis en el minuto 90, eres una presentación de Martínez Ares, un pasodoble canalla de Juan Carlos Aragón, eres una cervecita al sol oliendo a Blanco Cerrillo, una tortilla de patatas de mi santa madre, eres el mes de abril para Sevilla. Tu admiración ha sido mi motor en muchos momentos difíciles. Que venga lo que tenga que venir, que si voy contigo no tengo ningún miedo. Te quiero un bastinazo killa (y también a **Puchero**, que si no lo pongo seguro que me dices algo). A **Marita, Fausto** y **Rocío**, por hacerme sentir parte de esta nueva familia, no tengo duda que la suerte está de mi lado. Gracias por vuestro apoyo y vuestra alegría constante.

Al resto de mis primos y tíos de esta enorme y gran familia. En especial a mi **tía Victoria**, mis primas **Marta** y **Victoria**, mi **tía Ángela** y mi **tía Reyes**, porque vuestro apoyo y cariño me han guiado en los momentos más duros.

Siempre he presumido de tener muchos amigos, pero la vida te va demostrando que es un nombre que se queda grande y solo está al alcance de unos pocos. Pero los tengo, y tengo la enorme suerte de sentir que son mi apoyo incondicional, mis admiradores y mis criticones favoritos, los que me dan la vida con una cerveza o un partidito de pádel, los que aún desde la distancia me demuestran todo lo que me quieren.

A **Julia, Patricio, Pablo, Víctor, Irene, Martín, Ángel, Fran, Inés, Eli, Banana, Chete**, mis **Blancas, Cristina, Javi, Nico, Viki, Antoñete, Jess, Carmen**, mis **farmacéuticos**, mis **neuros**, especialmente **Álvaro** y **Ana mami**, que habéis sido una parte esencial de mi vida desde que aparecísteis. **Álvaro**, tu sin ser compañero de departamento me has ayudado y apoyado como si lo fueras, gracias por tu amistad y por compartir el camino de la investigación ¡Oh Rey **Álvaro**!. Y a mi **campito**, especialmente a **Inés** que tanto me ha ayudado en esta última etapa.

Como digo...tengo muchos amigos. Muchos de ellos empezaron como compañeros y se fueron ganando un sitio grande. Cuando entré siendo un pollito me enseñasteis todo, con tal alegría y motivación, que habéis sido mis referentes. **Marian**, tu fuiste la primera. Gracias por tu alegría y tu entrega. Por las charlas en comportamiento, por las tardes interminables en el CITIUS que a base de locuras se nos hacían hasta cortas. **Juan**, el eterno hermano mayor, el que guía y da su punto de sabiduría en el día a día. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tranquilizarme y darme tanta paz en los momentos más estresantes, por dar tu punto de vista tan realista y por las pachanguitas de baloncesto con una bola de papel de plata y una caja de hielo en las tardes que se hacían noche en el departamento. **Irene**, mi ángel de la guarda. Tu has estado de principio a fin. Gracias por la maravillosa RT-PCR hasta las tantas de la noche el día antes de entregar mi TFG, por mirarme de una forma tan bonita y hacerme sentir tan especial y valiosa. Gracias también por tu apoyo personal en esta última etapa, eres una persona muy especial capaz de todo. A mi equipo Cádiz, **Emilio, Luis y Guille**. No podría haber hecho el curso de animales con mejores compañeros. Volvería a repetir la experiencia millones de veces, incluso con la fiebre alta. A vuestro lado he trabajado muy feliz y espero que la vida os depare solo cosas buenas. A **Paco y Juan Carlos**, porque sin vuestra ayuda diaria y vuestra sonrisa todo hubiera sido más duro. Ya valoraba vuestro trabajo y esfuerzo cuando estábais, pero en cuanto os fuisteis, supe de buena mano el gran trabajo que habíais desarrollado y con esa alegría desbordante que os caracterizaba. **Rafa**, siempre tan callado, pasando desapercibido, pero guardas tanto bueno en ti...me siento muy afortunada de haber compartido tantos años contigo. Eres un excelente profesional y mejor persona. Gracias **Jenni** tu siempre tan dispuesta a aprender, tan inconformista y luchadora, tan dispuesta a apoyar al que tienes al lado. Eres luz. Gracias por tu apoyo constante. Gracias también a ti **Jesús**, por hacerme sentir tan especial y tan buena. De verdad me has hecho creer que era la más rápida del mundo con los cultivos primarios jajaja. Gracias por tu alegría y tus ganas de ayudar siempre. Gracias también a tantas y tantas personas que me han aportado tanto en este camino, a **Alicia, Sandra, Elo, María, Alberto, Maite, Montaña, Rocío**. Y no, no me he olvidado de **Paco Técnico Garantía Juvenil 2021** ni de **Merchi**. Vosotros habéis dejado una huella en mí imborrable. Me habéis hecho creer en mí de una forma que jamás he creído. Gracias por vuestro apoyo y vuestra amistad. Por vosotros haría

todos los días un Western Blot de proteínas fosforiladas e inyectaba a P1 tamoxifeno...pero no hace falta que os lo demuestre...por favor...igual me he calentado. Desde que entré en el departamento hace 7 años me habéis enseñado a ser mejor científica y mejor persona. Habéis hecho nuestro trabajo más bonito todavía.

He tenido la suerte también de tener como amiga, como madre en la ciencia, como inspiración, a mi directora **Rocío Ruiz**. Gracias por tu apoyo, tu motivación, por demostrarme lo que valgo, por tu confianza plena, por darme libertad y seguridad. Contigo trabajaría toda la vida, ansiosa y guerrera en el trabajo, pero sabiendo disfrutar de la vida. Suerte la mía que me tengas guardada en el móvil como Isa alumna interna, ha llovido ya, pero me recuerda que estuve en el sitio correcto, en el momento oportuno y con la mejor persona que me podía haber tutorizado. Sé que te tengo que compartir con **Sara**...bueno, mejor dicho, gracias por presentarla en mi camino. Gracias Sara por tu apoyo y tu alegría, tu motivación y tu forma de vivir, eres una inspiración y un ejemplo a seguir.

Gracias al **Marinerito** por demostrarme que también se puede seguir haciendo ciencia de calidad con una cerveza en el mano disfrutado de la vida.

A ti **José Luis**. Gracias por confiar en mí y darme la oportunidad de formar parte de este gran equipo. Ojalá algún día tener un 10% de tu memoria y sabiduría. Gracias también por tu buen gusto musical compartido a través del despacho.

Tu **Ana** has tenido la habilidad de hacerme sentir como una compañera, me has hecho sentir muy querida y valorada. Gracias por tu cercanía, tu sinceridad, tu amabilidad, tu sonrisa constante y tu apoyo.

A ti **Rocío Martínez**, por tu humanidad, tu puntito de mami que tienes con todos. Has sido junto a Antonio J mi saco de lágrimas y de ansiedad en esta última etapa. En la silla de llorar me he sentido libre de hablaros con sinceridad, de abrir mi corazón y mostraros mis miedos. Gracias a los dos por darme el espacio de confianza y seguridad para mostrarme tal y como soy, y por supuesto, por todo vuestro apoyo y comprensión.

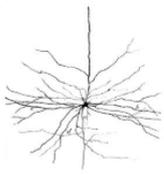
De ti **Antonio J** me llevo tantas y tantas cosas buenas...Me quedo con tu personalidad, con tu forma de vivir sin estrés, con tu creatividad, tus ganas, tu cercanía. Es curioso, pero durante este tiempo de tanto estrés he soñado contigo tranquilizándome. ¡Qué habilidad que lo hayas hecho tanto consciente como desde el subconsciente! Gracias por darme las herramientas para hacerme la loca del dibujo en power point. Si decido cambiar mi destino y dedicarme al arte, mi primera obra famosa te la regalaré.

A ti **Manolo**, gracias por tu cercanía, apoyo y por saber ver lo que nadie ve, por eso eres tan buen investigador y persona.

Muchas gracias **Marti** por tu alegría diaria y por endulzarnos la vida con fruta. A ti **Migue**, te agradezco sinceramente todo lo que he aprendido de ti y me alegro del equipo tan bonito que estás construyendo. **José Antonio**, gracias por estar siempre pendiente de mí de una forma tan sincera, me he sentido muy cuidada y valorada por tu parte. A vosotros, **Mario** y **Antonio Boza**, las viejas-nuevas incorporaciones. Me alegra ver como gente tan buena en la ciencia y en la vida encuentran su sitio. Con vosotros la ciencia se queda en muy buenas manos. Gracias por todo el apoyo que me habéis mostrado, por toda vuestra ayuda y disposición. Habéis sido una parte muy bonita de mi final de tesis. Gracias también a ti **Carmen**. Sé que las ideas preconcebidas no jugaron a mi favor al principio. Espero que hayas cambiado ya tu visión sobre mí, y además de ver que soy guerrera también soy trabajadora y buena persona jajaja. Gracias por tu confianza, tus charlas de media mañana, por darte cuenta de cómo estaba solo mirándome y por mostrarme tanto cariño. Y a tantos y tantos otros que me habéis ayudado a lo largo del camino, **Livia**, **Pablo**, **Sandro**, al **personal del CITIUS**, a las **conserjes de la Facultad de Farmacia** que también me han visto crecer los 10 años que llevo en mi querida Facultad y que me han dado mucho cariño.

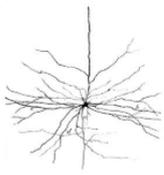
Ha sido una suerte poder compartir con vosotros la experiencia de la investigación. Hoy nuestros caminos se separan, pero el tiempo dirá. Gracias a todos, a vuestro lado he crecido enormemente como profesional y persona.

Y como no puede ser de otra manera, termino con una frase de carnaval *“Vivir sin dejar de sentir, que para ser feliz basta lo necesario”* y con vosotros ya lo tengo todo en la vida.



ABREVIATURAS

AC - Anticuerpo	DED - Dominios efectores de muerte
ADNc - ADN complementario	DED – Domino efector de muerte
AIM2 - Absent in melanoma 2	DISC – Complejo de señalización inductores de la muerte
Apo2L - Apoptosis-inducing ligand 2	DR - Receptores de muerte
ARNm - ARN mensajero	E - Día embrionario
Bak - Bcl-2 homologous antagonist/killer	EDTA - Ácido etilendiaminotetraacético
BAX - BCL2 associated X protein	EM - microscopia electrónica
Bcl2 - B-cell lymphoma 2	EPI - epiblasto
BDNF - Factor neurotrófico derivado del cerebro	FADD – Dominio de muerte asociado a Fas
BHE – Barrera hematoencefálica	FasL - Ligando de Fas
BSA – Albúmina de suero bovino	FasR - Receptor Fas
CA - Cuerno de Amón	FLIP_L - Proteína inhibidora similar a la FLICE-larga
CARD - Dominio de reclutamiento de Caspasas	Gal3 – Galectina 3
c-IAP1 - Proteína inhibidora de la apoptosis 1	GD - Giro dentado
Clec7a - C-type lectin domain family 7 member A or Dectin-1	GFAP - Proteína ácida fibilar glial
CMH - Células madre hematopoyéticas	GSK3 - Glucógeno sintasa quinasa 3
COX2 - Ciclooxygenasa-2	IBA1 – Molécula adaptadora de fijación de calcio ionizado 1
CPA - Célula presentadora de antígeno	IGF1 - Factor de crecimiento insulínico 1
CreER - Recombinasa Cre con el receptor de estrógeno	IL - Interleucina
CSF1 - Factor 1 estimulante de colonias del factor de crecimiento	KO - Knock-out
CSF1R – Receptor del factor 1 estimulante de colonias del factor de crecimiento	LIF - Factor inhibidor de la leucemia
CX3CR1 - CX3C chemokine receptor 1 or fractalkine	LPS - Lipopolisacárido
DAB – 3´3 Diaminobencidina	LTD - depresión a largo plazo
DAM – Microglía asociada a daño	LTP - potenciación a largo plazo
DCX - Doblecortina	MCP - Muerte celular programada
DD - Dominio de muerte (DD, del inglés <i>Death domain</i>)	MertK - Mer tirosina quinasa
	MLKL - Quinasa de linaje mixto
	NAMPs - Patrones moleculares asociados a neurodegeneración
	NF-κB - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas



ABREVIATURAS

NGF - Factor de crecimiento neural

NHA Neurogénesis hipocampal adulta

NLR - Receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos formadores de inflamomas

NMDA - N-metil-D-aspartico

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintasa

NOS2 - Ácido nítrico óxido sintasa 2

NPC - Células progenitoras neurales

NSC - Células madre neurales

OPC - Células precursoras de oligodendrocitos

P- Día post natal

PAM - Microglía asociada a región proliferativa

PAMPs - Patrones moleculares asociados a patógenos

PARP - Poli ADP ribosa polimerasa

PBS - Phosphate buffer solution

PBS-T1% - PBS-Tritón al 1%

PC - Placa cortical

PCR - Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K - fosfoinositida-3 quinasa

PrE - Endodermo primitivo

PRRs - Receptores de reconocimiento de

RIP - Proteína de interacción con el receptor

RIPK1/RIPK3 - Proteína quinasa 1/3 de interacción con el receptor

RMS - Corriente/caminoamino migratorio rostral

ROS - Especies reactivas de oxígeno

RT-PCR - PCR a tiempo real

SDS - Sodium dodecyl sulfate

SGZ - Zona subgranular

SN - Sistema nervioso

SNC - Sistema nervioso central

SVZ - Zona subventricular

TAE - Tris base/ácido acético/EDTA

TBS - Tris-buffered salino

TE - Trofoectodermo

TGS - Tris Base/Glycine/SDS

TH-IRES - Tyrosine hydroxylase-internal ribosomal entry sequence

TLR - Receptores de tipo toll

TNF - Factor de necrosis tumoral

TNFR1 - Receptor del factor de necrosis tumoral 1

TRADD - Proteína de dominio de muerte asociada al receptor de TNF tipo 1

TRAF2 - Factor 2 asociado al receptor de TNF

TRAILR1/2 - Receptor del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF 1/2

TREM2 - Receptor activador expresado en las células mieloides 2

TRIF - Interferón- β inductor del adaptador que contiene el dominio TIR

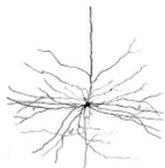
VEGF - Factor de crecimiento endotelial vascular

WB - Western Blot

WT - Wild type

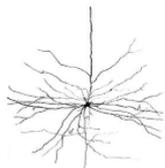
ZI - Zona intermedia

ZV - Zona ventricular



ÍNDICE

RESUMEN	pág.1
INTRODUCCIÓN	pág.3
CAPÍTULO I. MICROGLÍA	pág.3
I.1 Definición molecular e historia.....	pág.3
I.2 Origen y migración.....	pág.3
I.3 Identificación de microglía y diferenciación con macrófagos.....	pág.6
I.4 Estructura y fenotipos.....	pág.7
I.5 Funciones de la microglía en el SNC	pág.11
I.6 Microglía asociada a neurodegeneración	pág.15
I.7 Modulación de la microglía a través de las caspasas	pág.17
CAPITULO II. CASPASAS	pág.18
II.1 Definición molecular	pág.18
II.2 Clasificación	pág.18
II.2.1 Caspasas inflamatorias	pág.18
II.2.2 Caspasas asesinas	pág.19
II.3 Funciones clásicas: iniciadoras-efectoras de apoptosis	pág.19
II.4 Caspasas más allá de la apoptosis	pág.23
SUBCAPITULO I.I. LA IMPLICACIÓN DE CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO	pág.24
SI.1 Etapas iniciales del desarrollo embrionario	pág.24
SI.2 Desarrollo embrionario- importancia de la muerte celular	pág.28
SI.3 Mecanismos necroptóticos durante la embriogénesis	pág.28
SI.4 Caspasa 8 en el desarrollo embrionario	pág.30
SI.5 Implicación de la Caspasa 8 en la microglía durante la embriogénesis	pág.32
SUBCAPITULO I. II. LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 3 EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA	pág.34
SII.1 Neurogénesis	pág.34
SII.2 Microglía y neurogénesis	pág.37
SII.3 Caspasa 3 más allá de la apoptosis	pág.39
OBJETIVOS	pág.42
SUBCAPITULO I.I. La implicación de la Caspasa 8 en el desarrollo embrionario...	pág.42
SUBCAPITULO I. II. La implicación de la Caspasa 3 en la neurogénesis hipocampal adulta.....	pág.42
MATERIAL Y MÉTODOS	pág.44
1 Modelos animales	pág.44
1.1. Modelo Caspasa 3 ^{ff} -CX3CR1Cre	pág.44

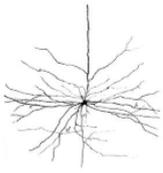


ÍNDICE

1.2. Modelo Caspasa 8	pág.45
2 Genotipado	pág.47
3 Obtención de los tejidos experimentales	pág.48
3.1 Obtención de muestras y perfusión intracardiaca de los sujetos Caspasa 3 CX3R1Cre.....	pág.48
3.2 Obtención de Embriones Caspasa 8 KO.....	pág.48
4 Pruebas conductuales de la línea Caspasa 3 ^{ff} -CX3CR1Cre.....	pág.48
4.1 Rotarod	pág.49
4.2 Test en campo abierto	pág.49
4.3 Test de enterramiento de canicas	pág.49
4.4 Reconocimiento de objetos	pág.50
4.5 Laberinto en y	pág.50
5 Análisis de los niveles de expresión de ARN mensajero	pág.50
5.1 Extracción de ARN	pág.50
5.2 Retrotranscripción del ARN	pág.51
5.3 PCR cuantitativa o en tiempo real	pág.52
6 Preparación de muestras para el análisis de imagen	pág.54
7 Inmunotinción	pág.55
7.1 Inmunofluorescencia	pág.55
7.2 Inmunohistoquímica	pág.57
7.3 Toma y procesamiento de imágenes de inmunofluorescencia	pág.58
7.4 Toma y procesamiento de imágenes de inmunohistoquímica	pág.58
7.4.1 Cuantificación y fenotipaje de microglía	pág.58
7.4.2 Estereología	pág.59
8 Análisis de los niveles de expresión de proteínas	pág.59
8.1 Extracción proteínas	pág.59
8.2 Cuantificación proteínas totales	pág.60
8.3 Western blot	pág.60
9 Análisis estadístico	pág.62

RESULTADOS

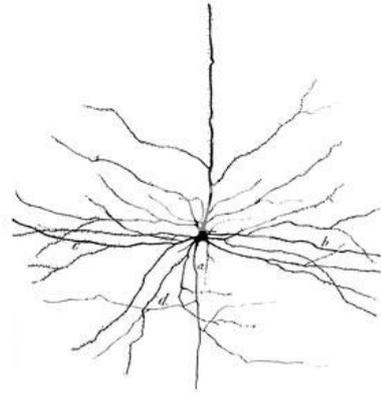
CAPITULO I.I. La implicación de Caspasa 8 en el desarrollo embrionario	pág.63
SI.1 Caracterización del modelo animal Caspasa 8 THIRESCre	pág.63
SI.2 La delección de Caspasa 8 durante la embriogénesis supone una menor diferenciación morfológica y deficiente conservación tisular	pág.64
SI.3 La Caspasa 8 se expresa de manera ubicua durante la embriogénesis	pág.65

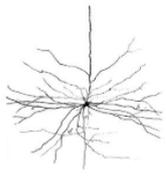


Í N D I C E

SI.4 Estudio del efecto de la delección de Caspasa 8 en el desarrollo embrionario de la microglía	pág.66
SI.4.1 La delección de Caspasa 8 supone una reducción de diversos marcadores de microglía homeostática durante la embriogénesis	pág.66
SI.4.2 La reducción de microglía homeostática durante la embriogénesis en ausencia de Caspasa 8 va asociado a un descenso de marcadores de activación microglial	pág.68
SI.5 Estudio del efecto de la delección de Caspasa 8 en la proliferación	pág.72
SI.6 La ausencia de Caspasa 8 durante la embriogénesis reduce la actividad fagocítica microglial	pág.73
SI.7 Estudio del efecto de la delección de Caspasa 8 en la expresión de marcadores temporales de neurogénesis	pág.73
SI.8 Estudio del efecto de la delección de Caspasa 8 en la inflamación	pág.74
SI.9 Estudio del efecto de la delección de Caspasa 8 en la necroptosis	pág.76
CAPITULO I. II. La implicación de Caspasa 3 en la neurogénesis hipocampal adulta	pág.79
SII.1 Caracterización del modelo animal Caspasa3CX3CR1	pág.79
SII.2 La delección de Caspasa 3 en la microglía altera el número y la morfología de la microglía	pág.80
SII.3 Disminución de actividad fagocítica microglial en ausencia de Caspasa 3 ...	pág.86
SII.4 Efecto de la delección de Caspasa 3 en la formación de nuevas neuronas en el giro dentado	pág.87
SII.5 Efecto de la delección de Caspasa 3 en la conducta	pág.89
SII.5.1 Evaluación del comportamiento motor - los ratones Caspasa 3 CX3R1Cre KO muestran una actividad locomotora típica	pág.89
SII.5.2 Evaluación de la ansiedad o depresión - los ratones Caspasa 3 CX3R1Cre KO muestran deficiencias en el comportamiento cognitivo	pág.90
DISCUSIÓN	pág.92
CAPITULO I.I. La implicación de Caspasa 8 en el desarrollo embrionario	pág.92
CAPITULO I. II. La implicación de caspasa 3 en la neurogénesis hipocampal adulta	pág.100
CONCLUSIONES	pág.104
CAPITULO I.I. La implicación de Caspasa 8 en el desarrollo embrionario	pág.104
CAPITULO I. II. La implicación de caspasa 3 en la neurogénesis hipocampal adulta	pág.105
BIBLIOGRAFÍA	pág.106

RESUMEN





RESUMEN

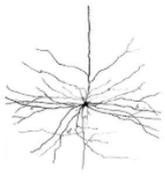
Debido al aumento de la esperanza de vida, existe cada vez una mayor prevalencia de enfermedades neurodegenerativas que, junto con su frecuente etiología desconocida, puede llegar a ser un problema socioeconómico y sanitario de alta importancia. Por ello, todos los esfuerzos actuales se están centrando en la búsqueda de dianas biológicas que permita, al menos, mejorar la calidad de vida de los pacientes y, evitar el avance de estas enfermedades. Cada vez son más las evidencias de la implicación de la activación sostenida de la microglía, las células inmunes del cerebro, en el desarrollo de estas patologías neurodegenerativas.

Por todo esto, nuestro grupo, además de estudiar mecanismos de control de la función microglial, tiene también como objetivo el estudio de las funciones más allá de la apoptosis de las Caspasas, clásicamente asociadas a esta función de muerte. Entre las funciones no apoptóticas, se ha identificado el papel de estas proteínas como moduladoras de la función microglial, y con ello, una posible herramienta de control para regular la activación de la microglía.

Con estos precedentes, el objetivo principal de este estudio fue investigar dos modelos murinos carentes de Caspasa 8 y de Caspasa 3, con el planteamiento específico de estudiar qué papel jugaban dichas proteínas en el desarrollo embrionario de la microglía y en la neurogénesis hipocampal adulta, respectivamente.

El desarrollo embrionario es un periodo de potente recambio celular, en el que, para garantizar la correcta homeostasis, no solo es necesaria la formación de nuevas células y conexiones, sino también mantener activas las vías de muerte. Es ahí, donde entra en juego la Caspasa 8, no solo en el inicio de la vía extrínseca de la apoptosis si no también en la regulación de la necroptosis, otra vía de muerte reconocida fisiológica. Más allá de los papeles pro-apoptóticos de la Caspasa 8, queda claro su función pro-supervivencia debido a que su ausencia genera, de media, la muerte en la etapa embrionaria E10.5. Tras corroborar las evidencias publicadas en los sujetos carentes de Caspasa 8, procedimos a estudiar el estado de la microglía, obteniendo un descenso significativo de los niveles de microglía tanto homeostática como reactiva a E13.5. Los datos mostrados hacen pensar que no es debido a un problema de migración desde el saco vitelino, sino que todo apunta a un problema en la supervivencia y proliferación, no solo de la microglía sino de las neuronas.

La neurogénesis hipocampal adulta (NHA) es un proceso implicado en numerosas enfermedades neurodegenerativas. Muchos investigadores han descrito la microglía como un componente clave en la regulación de la formación y migración de nuevas neuronas a lo largo de la corriente migratoria rostral. El segundo objetivo principal de este trabajo es identificar el papel de la Caspasa 3 en las funciones microgliales relacionadas con la neurogénesis.

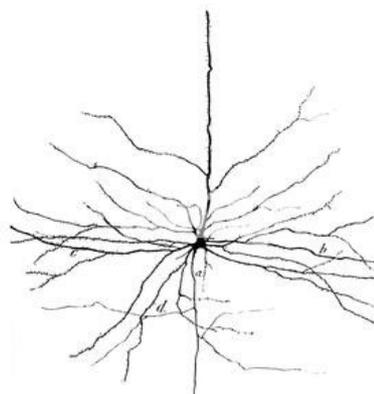


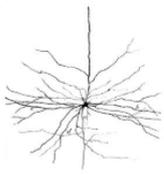
RESUMEN

Para abordar este estudio, se utilizaron ratones mutantes condicionales de Caspasa 3 en la línea celular de microglía. Con esta herramienta, queríamos dilucidar el papel de esta proteína en la función microglial en el hipocampo, la principal región donde tiene lugar la neurogénesis adulta. Tras la supresión de la Caspasa 3 en la microglía, los ratones mutantes mostraron una reducción de la microglía en el hipocampo, mostrando una morfología menos activa. Mediante el análisis de imágenes de alta resolución, también observamos una reducción de la capacidad fagocítica de la microglía carente de Caspasa 3. Además, encontramos una reducción de las neuronas neurogénicas en los ratones *knockout* de Caspasa 3. El análisis conductual mediante pruebas de reconocimiento de objetos y de laberinto en Y mostró una alteración de la memoria y el aprendizaje en ausencia de la Caspasa 3 microglial. En conjunto, estos resultados mostraron el papel esencial de la Caspasa 3 en la función microglial y destacan el papel relevante de este fenotipo microglial específico en el mantenimiento de la NHA en el hipocampo.

Por todo ello, podemos seguir aportando nuevas pruebas de las funciones más allá de la apoptosis de estas proteínas quinasas y con ello, esperanzadoras herramientas que nos permitan controlar la activación microglial y las consecuencias de las enfermedades a las que se ha ido asociando.

INTRODUCCIÓN





CAPÍTULO I. MICROGLÍA

I.1 DEFINICIÓN MOLECULAR E HISTORIA

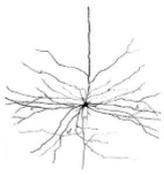
La primera descripción de la glía data de Virchow (1858), quien la describió como elementos neuronales pasivos y el "tejido conjuntivo" o "pegamento" del cerebro (**Virchow, 1858; Reemst et al., 2016**).

Posteriormente en el trabajo de Nissl (1899), Robertson (1899) y Ramón y Cajal (1909) la microglía se definió como "elementos gliales reactivos", "mesoglia" y "el tercer elemento neuronal", respectivamente, como manera de explicar el origen separado de las neuronas y la macroglía (**Rezaie et al., 2002; Reemst et al., 2016**). A pesar de que la hipótesis de Robertson terminó siendo cierta, más tarde se demostró que la "mesoglia" que describió era en realidad oligodendrocitos. El nombre actual de "Microglía" fue acuñado por el alumno de Santiago Ramón y Cajal, Pio Del Rio-Hortega, quien describió las células como elementos no neuronales que eran distintos de la macroglía neuroectodérmica: la oligodendroglía y la astroglia, discriminando aún más entre los elementos mesodérmicos verdaderos de los oligodendrocitos (**Del Río-Hortega, 1919; Rezaie et al., 2002; Kierdorf y Prinz., 2013; Reemst et al., 2016**).

La microglía junto con otras poblaciones de glía como astrocitos y oligodendrocitos forman una red dinámica que garantiza el entorno correcto para el desarrollo y mantenimiento homeostático del sistema nervioso central (SNC) (**Shen et al., 2017**). La microglía son células mieloides residentes altamente especializadas y dinámicas que representan aproximadamente el 10% de las células totales dentro del SNC adulto (**Masuda y Prinz., 2016; Wolf et al., 2016; Wlodarczyk et al., 2017**). Estas células presentan actividad fagocítica y de presentación de antígeno (CPA), siendo responsables de la respuesta inmune innata del SNC. Están implicadas en la homeostasis del cerebro, en los procesos de daño cerebral, en la respuesta neuroinflamatoria y en la neurodegeneración (**Cartier et al., 2014; Prinz et al., 2014**). Además, a lo largo de la vida, la población neuronal en el cerebro sufre múltiples desafíos diferentes que requieren que la microglía reaccione y ejecute diferentes funciones (**Shen et al., 2017**).

I.2 ORIGEN Y MIGRACIÓN

Las células microgliales son las primeras células gliales observadas en el cerebro y se desarrollan junto con las neuronas durante el período crítico del desarrollo cerebral embrionario temprano (**Pont-Lezica et al., 2014**). Aunque la microglía se ha estudiado durante más de 100 años, su origen ha sido históricamente controvertido (**Ginhoux y Prinz., 2015**). Algunos científicos, incluido el propio Pio del Rio-Hortega, argumentaron que la microglía se originó a partir de células madre hematopoyéticas (CMH) debido a su parecido fenotípico y morfológico



INTRODUCCIÓN

con los macrófagos y monocitos del tejido periférico (*Río Hortega., 1919; Han et al., 2017*). Otras hipótesis sugieren su origen a partir de pericitos asociados a vasos sanguíneos (*Barón y Gallego., 1972*) o de macrófagos del saco vitelino. También se consideró la microglía como los fagocitos mononucleares residentes en tejidos periféricos, que derivaron de monocitos sanguíneos circulantes derivados de la médula ósea (*Han et al., 2017*).

La controversia parece haberse resuelto, ya que son numerosas y crecientes, las evidencias que respaldan la hipótesis del origen en el saco vitelino, oponiéndose, por tanto, a la hipótesis clásica del origen monocítico. Ésta postula que la microglía se desarrolla a partir de progenitores mieloides primitivos del saco vitelino (días embrionarios E6.5-7.5), desde donde posteriormente coloniza el neuroepitelio durante las etapas tempranas de la embriogénesis, entre los días embrionarios (E) 8.5 y E9.5 (*Figura 1*), antes de que el cierre de la barrera hematoencefálica (BHE) restrinja la migración celular al cerebro (*Alliot et al., 1991; Alnemri et al., 1996; Alliot et al., 1999; Allan et al., 2007; Ginhoux et al., 2010; Schulz et al., 2012; Kierdorf et al., 2013; Christensen et al., 2014; Reemst et al., 2016; Turano et al., 2017; Tay et al., 2017c*). Estas células primitivas son capaces de dar lugar a microglía y macrófagos. A lo largo de la migración al SNC en desarrollo, van adquiriendo marcadores específicos de macrófagos de manera gradual hasta que se establecen en el tejido cerebral y se diferencian a células microgliales. Por ello, se podría decir que la microglía se trata de una población de macrófagos residentes del SNC con claras diferencias genéticas que surgen exclusivamente del saco vitelino embrionario, lo que explicaría algunas de las variaciones en la respuesta inflamatoria de ambos tipos celulares (*Alliot et al., 1999; Schulz et al., 2012; Kierdorf et al., 2013; Perdiguero et al., 2015; Shen et al., 2018*).

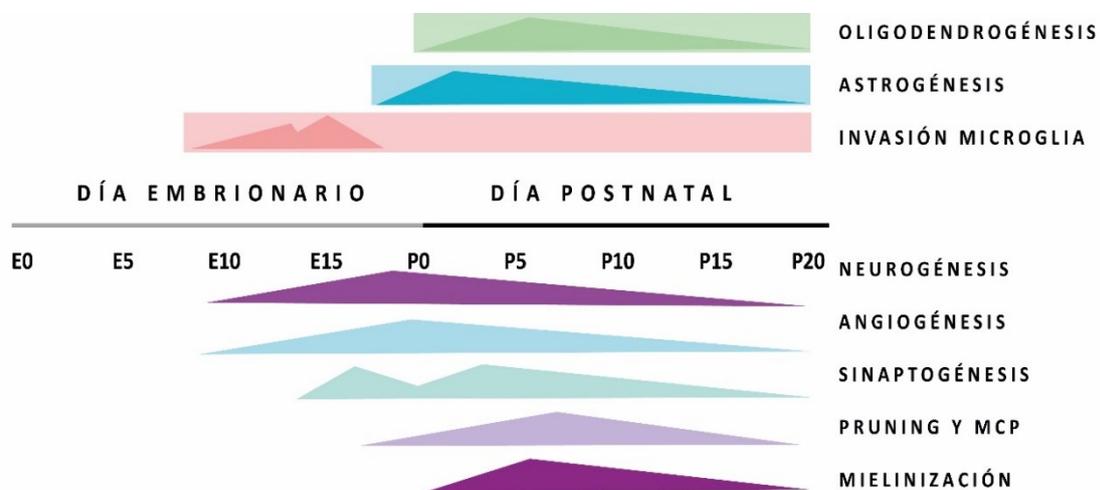
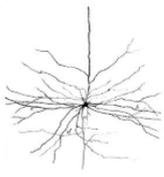


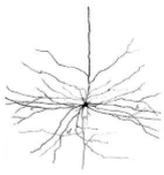
Figura 1. Línea de tiempo de invasión de microglía, gliogénesis y varios procesos de desarrollo en el cerebro de ratón. Los rectángulos indican los períodos estimados durante / a partir de los cuales microglía, astrocitos y oligodendrocitos permanecen presentes en el cerebro. Los triángulos indican el inicio de los procesos de desarrollo indicados. Abreviaturas: E, embrionario; P, postnatal; MCP, muerte celular programada. Elaborada a partir de la imagen de *Reemst et al., 2016*.



INTRODUCCIÓN

La invasión microglial al SNC se cree que ocurre en dos fases (*Figura 1*) (**Swinnen et al., 2013**). En ratones, la primera fase ocurre entre E8.5 y E14.5 durante la cual los progenitores de microglía comienzan a colonizar el cerebro y el número de células microgliales aumentan gradualmente (**Swinnen et al., 2013**). Este primer aumento gradual de microglía probablemente es causado por una rápida proliferación de microglía pre-ingresada junto con la invasión de algunos nuevos precursores de microglía (**Swinnen et al., 2013**). Alrededor de E9.5, los primeros brotes capilares comienzan a invadir el neuroepitelio (**Vasudevan y Bhide., 2008**). La segunda fase se produce entre E14 y E16, donde se desencadena un segundo aumento masivo en el número de microglía, lo que no puede explicarse solo por la proliferación, ya que el número de microglías proliferantes disminuye en E14.5 (**Swinnen et al., 2013**). Este aumento se asocia, por tanto, a la entrada de una nueva ola de progenitores de microglía que ingresan al cerebro desde la periferia (**Arnold y Betsholtz, 2013; Swinnen et al., 2013**). El número de células microgliales continúa aumentando, aunque más lentamente, hasta E17.5, período durante el cual se diseminan por todo el cerebro (**Swinnen et al., 2013**). Entre E10 y E12 se observan los primeros progenitores de microglía ameboide en la superficie de la piamadre (SP) en las meninges y dentro de los ventrículos laterales. En estas etapas embrionarias tempranas, solo se pueden detectar algunas células microgliales proliferativas y altamente móviles en el neuroepitelio (*Figura 2.A*) (**Swinnen et al., 2013**). Durante el desarrollo del cerebro embrionario de ratón, entre E14 y E16 (*Figura 2.B*), la microglía ameboide se transforma en microglía ramificada y la proporción de microglía con procesos largos aumenta con el tiempo (**Swinnen et al., 2013**). Curiosamente, hasta aproximadamente E16.5 microglía no entra en la placa cortical (PC) (**Swinnen et al., 2013; Squarzoni et al., 2014**). Antes de la colonización de la PC, la microglía se detecta en las zonas ventriculares (ZV) y zonas intermedias (ZI) (**Swinnen et al., 2013**), regiones que contienen las células progenitoras neurales. Alrededor de E17, la microglía comienza gradualmente a invadir la PC a partir de las capas más profundas, proceso durante el cual también se vuelve más ramificada (*Figura 2.C*).

En contraste con la distribución más o menos homogénea de la microglía en el cerebro adulto, en el sistema nervioso (SN) la microglía embrionaria se distribuye de manera desigual (**Swinnen et al., 2013; Squarzoni et al., 2014**). Se pueden encontrar muy cerca de células gliales radiales, células en apoptosis, vasos sanguíneos, axones y sinapsis, donde se cree que intervienen en la neurogénesis y la gliogénesis, la muerte celular (**Swinnen et al., 2013**), la angiogénesis, la proliferación y poda axonal y la sinaptogénesis (**Squarzoni et al., 2014; Reemst et al., 2016**). Por tanto, la distribución de la microglía embrionaria da una idea de sus funciones variadas en el cerebro en desarrollo.



INTRODUCCIÓN

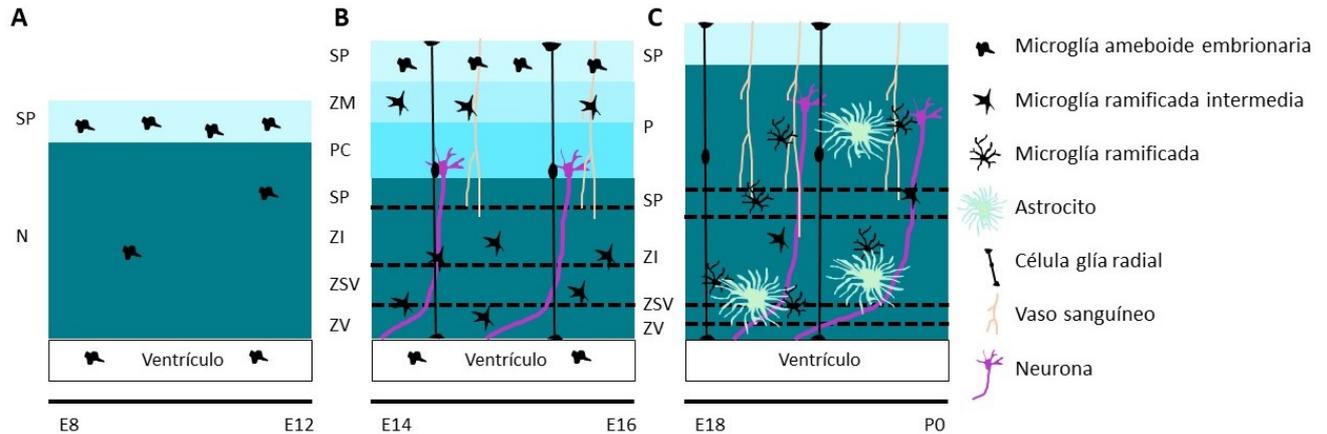
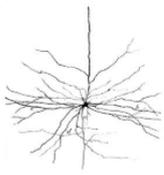


Figura 2. Representación esquemática de la distribución y maduración de microglía y el comienzo de la astrogénesis en la corteza cerebral de ratón. Abreviaturas: SP, superficie piamadre; N, neuroepitelio; ZM, zona marginal; PC, placa cortical; SP, subplaca; ZI, zona intermedia; ZSV, zona subventricular; ZV, zona ventricular; P, parénquima. Elaborada a partir de imagen de Reemst et al., 2016.

Finalizado el proceso de migración, desarrollo y diferenciación, la microglía ya establecida en el SNC adquiere un fenotipo estable (Ginhoux et al., 2010; Matcovitch-Natan et al., 2016) y, dada esta temprana colonización la microglía está lista para desempeñar un papel importante en la formación del SNC en desarrollo y contribuir a su funcionamiento (Reemst et al., 2016).

1.3 IDENTIFICACIÓN DE MICROGLÍA Y DIFERENCIACIÓN CON MACRÓFAGOS

Durante muchos años la microglía se ha considerado como los macrófagos del SNC, en gran parte fundado en los hallazgos de Pio del Río Hortega, el cual defendió que la microglía presentaba un origen mesodérmico y no ectodérmico, la capa embrionaria donde se produce la diferenciación del SN, y apuntaba a progenitores sanguíneos que se identificaron finalmente como monocitos (Tremblay, et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que la población microglial comparte origen mieloide y los progenitores con los macrófagos, ontogenéticamente hoy se sabe que en las primeras etapas de la embriogénesis migran del saco vitelino al mesodermo mientras que los macrófagos periféricos proceden de los monocitos originados a partir de las células madres hematopoyéticas que maduran en médula ósea (Ginhoux, et al., 2010; Kierdorf, et al., 2013; Gómez Perdiguero et al., 2013; Jurga et al., 2020).



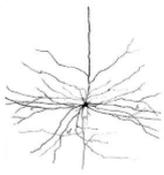
I.4 ESTRUCTURA Y FENOTIPOS

De manera similar a los macrófagos tisulares en la periferia, la microglía también se ha venido subdividiendo tradicionalmente en dos categorías funcionales: el fenotipo M1 proinflamatorio, clásicamente activado y caracterizado por la producción de mediadores proinflamatorios y neurotóxicos; y el fenotipo M2 antiinflamatorio, implicado en la reparación y remodelación tisular (*Han et al., 2016; Turano et al., 2017*).

Sin embargo, cabe destacar que cada vez está perdiendo más peso esta división tan simplista, ya que la microglía puede existir en otros estados de activación. Las células de microglía actualmente se consideran una población homogénea extremadamente plástica y que experimenta numerosos cambios estructurales y funcionales, acompañados de cambios transcripcionales y de receptores (*Haynes, et al., 2006*) dependiendo de la etapa de la vida, la región del SNC y el factor estresante o el insulto patológico para dar respuesta a las necesidades del entorno (*Martinez y Gordon., 2014; Ransohoff, 2016*). Siguiendo este punto de vista, la microglía cumpliría sus numerosas funciones a través de su reacción hacia múltiples fenotipos, cada uno asociado a una firma molecular distinta (*Crain et al., 2013; Hickman et al., 2013; Butovsky et al., 2014; Grabert et al., 2016; Flowers et al., 2017; Galatro et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Bennett et al., 2018; Hammond et al., 2018; Masuda et al., 2019*).

Sin embargo, Stratoulías y col. proponen que la microglía constituye una población heterogénea que tiene propiedades intrínsecas y especializaciones funcionales distintas que se adquirirían durante su maduración o función dentro del SNC (*Stratoulías et al., 2019*). Estos subtipos coexistirían en el estado estacionario y experimentarían una mayor modulación o transformación fenotípica en respuesta a los distintos estímulos. Es decir, la propuesta va más allá de la visión de la microglía como célula única que polariza a distintos fenotipos, la microglía podría ser considerada como una comunidad de células en la que diferentes miembros muestran propiedades distintas, realizan funciones fisiológicas distintas, y responden de manera diferente a los estímulos (*Stratoulías et al., 2019*).

La evidencia acumulada indica que la microglía no es el tipo de célula ingenua que invariablemente responde de manera idéntica a cualquier tipo de estímulo posible al asumir un fenotipo predeterminado. De hecho, desde una perspectiva histórica, la noción de subtipos microgliales ya había sido propuesta en 1919 por Río-Hortega en su descripción original de la microglia (*Río-Hortega, 1919b*). Observó que algunas microglías que denominó microglías "satélite" se encontraban muy cerca de los cuerpos de las células neuronales. Un siglo después, se propone que la microglía satélite, que se analiza a continuación, podría representar uno de los subtipos de microglía.



INTRODUCCIÓN

En este sentido resulta necesario diferenciar los conceptos de subtipos y los estados celulares de activación. El estado de reacción se refiere a los distintos fenotipos y funciones asociadas que un tipo de célula puede adquirir en respuesta a un determinado estímulo. Sin embargo, un subtipo se define por las propiedades, característica y funciones intrínsecas independientes del microambiente (**Stratoulas et al., 2019**). Los datos emergentes respaldan la existencia de supuestos subtipos microgliales dotados de especializaciones genómicas, espaciales, morfológicas y funcionales únicas (**Stratoulas et al., 2019**).

En condiciones fisiológicas, la microglía se presenta en un estado de reposo u homeostático caracterizada morfológicamente por un pequeño cuerpo celular y una morfología ramificada (*Figura 3.A*) que exploran activa y eficientemente el ambiente adyacente, asegurando la homeostasis del SNC (**Gautier et al., 2012; Hickman et al., 2013; Kierdorf y Prinz., 2013; Christensen et al., 2014; Butovsky et al., 2014**).

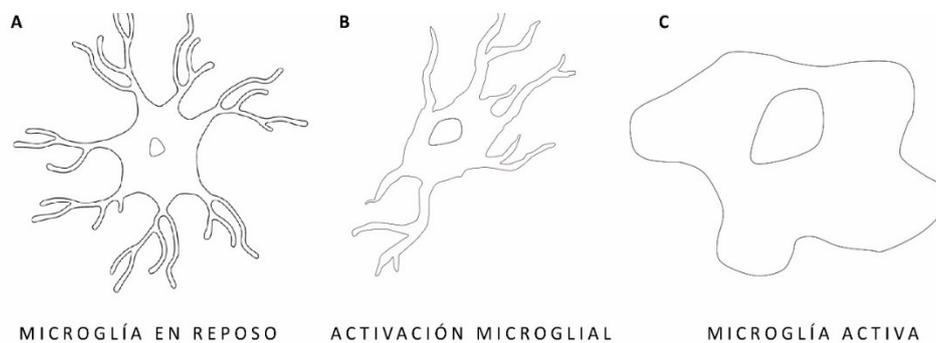
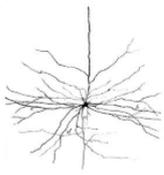


Figura 3. Representación de los cambios morfológicos experimentados durante la activación microglial. A. La microglía en reposo presenta un pequeño soma y ramificaciones abundantes. B. Durante la activación se produce el acortamiento retracción y engrosamiento de las ramificaciones y del soma. C. La microglía activa se caracteriza por presentar una morfología ameboide. Imagen de elaboración propia.

Cuando la microglía se activa en respuesta a estímulos que atentan contra la homeostasis, pasa por un estado inicial de activación que conlleva un engrosamiento de las ramificaciones y aumento del tamaño celular (*Figura 3.B*). Finalmente, se produce la retracción completa de las ramificaciones y un aumento del tamaño del cuerpo celular, adquiriendo morfología ameboide (*Figura 3.C*) con capacidad fagocítica liberando moléculas bioactivas, lo que contribuye a la generación de respuestas inflamatorias y a combatir la invasión externa en sitios dañados (**Heneka et al., 2014; Jin y Yamashita., 2016; Colonna y Butovsky., 2017**).

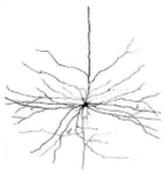
Como se ha mencionado anteriormente, la definición de fenotipos anti y proinflamatorios no cubre las necesidades para describir los estados de la microglía. En esta línea, se han descrito distintos subtipos de microglías con un perfil genético característico.



INTRODUCCIÓN

En este sentido, se ha identificado un nuevo subtipo microglial neurodegenerativo asociado a daño (DAM, del inglés *damage associated microglia*) (**Wang et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Lee et al., 2018**). Este subtipo conlleva la supresión de diversos genes asociados al fenotipo homeostático de la microglía, perdiendo así, sus funciones protectoras. La transición del fenotipo homeostático hacia DAM parece estar asociado a la liberación de patrones moleculares asociados a neurodegeneración (NAMPs del inglés *neurodegeneration associated molecular patterns*), moléculas que incluyen restos de mielina, agregados de proteínas extracelulares o señales de daño neuronal presentes en los cuerpos apoptóticos (**Poliani et al., 2015; Wang et al., 2015; Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Deczkowska et al., 2018**). Estos NAMPs se unen al receptor activador expresado en las células mieloides 2 (TREM2, del inglés *activating receptor expressed on myeloid cells 2*), lo que causa la activación microglial. La DAM microglía se ha asociado principalmente a zonas del SNC afectadas en determinadas enfermedades neurodegenerativas como en la enfermedad de Alzheimer, colocalizando con las placas amiloides, característica fisiopatológica de dicha enfermedad (**Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017; Deczkowska et al., 2018**). También se han observado en regiones afectadas en la enfermedad de Parkinson (**Leyns et al., 2017; Friedman et al., 2018**), en otras enfermedades neurodegenerativas, así como en el envejecimiento (**Olah et al., 2018**).

El perfil genético de la microglía DAM se caracteriza por una disminución de los genes homeostáticos de microglía como *cx3cr1*, *tgfb1*, *mafb*, la proteína transmembrana 119 (*tmem119*), y del receptor purinérgico *p2ry12* que reconoce adenosina difosfato extracelular, una de las señales de daño neuronal (**Keren-Shaul et al., 2017**) que actúa induciendo quimiotaxis microglial hacia las regiones dañadas, así como la fagocitosis de los restos celulares (**Davalos et al., 2005**) (Figura 4). A su vez, experimenta una regulación al alza de genes como *Lgals3* (Galectina 3; Gal3) (**Mathys et al., 2017**), *clec7a*, *trem2* (**Keren-Shaul et al., 2017**), entre otros (Figura 4).



INTRODUCCIÓN

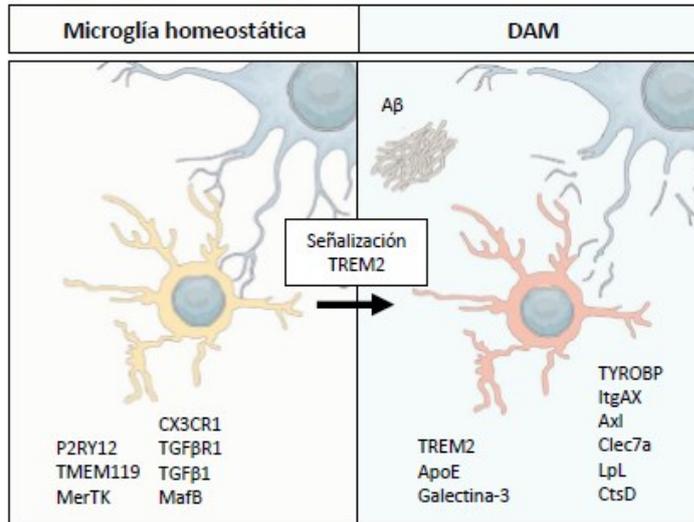
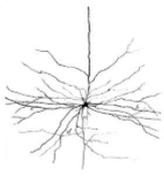


Figura 4. Inducción de la microglía homeostática a microglía DAM. Cada fenotipo se caracteriza por una firma transcripcional única. La microglía homeostática expresa receptores como *cx3cr1*, *tgfb1*, *mafb*, *tmem119*, *p2ry12*, *MertK*. El cambio a fenotipo DAM supone un descenso de los genes homeostáticos y una regulación al alza de *Gal3*, *clec7a*, *trem2* o *ApoE*. Adaptado de **Deczkowska et al. 2018**.

Existe un punto de control que facilita el paso de la microglía desde un fenotipo DAM a homeostática, con el objetivo de regular la activación inmune y sus posibles consecuencias para el tejido circundante. Un ejemplo es el receptor CX3CR1 que al interactuar con sus ligandos promueven el estado homeostático microglial (**Biber et al., 2007**). Todo esto sugiere la posibilidad de que para pasar a fenotipo DAM sea necesario desarrollar mecanismos de bloqueo de esta restricción como requisito previo (**Keren-Shaul et al., 2017**). Este sistema de control se ve desregulado en situaciones fisiológicas como el envejecimiento, lo que conlleva, entre otros efectos en el SNC, la reducción de la capacidad fagocítica y la transformación de la microglía residente en DAM (**Galatro et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017**).

Una de las moléculas reguladas al alza en la microglía DAM es Gal3. Gal3 es una lectina de unión a β-galactósido inmunomoduladora importante en numerosas actividades biológicas incluida la proliferación celular, la regulación apoptótica, la fibrosis, la defensa del huésped y en la inflamación. Gal3 puede unirse y activar diferentes receptores microgliales, incluidos TREM2 (**Boza-Serrano et al., 2019**) y el receptor TLR4 (**Burghillos et al., 2015**) por lo que podría tener el papel de modular el estado microglial. Estudios recientes han demostrado que Gal3 es uno de los genes más fuertemente inducidos en modelos animales de diversas enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la esclerosis múltiple y el Parkinson, sugiriendo así un papel como regulador esencial en la respuesta inflamatoria en enfermedades neurodegenerativas (**Boza-Serrano et al., 2014; Krasemann et al., 2017; Mathys et al., 2017; Boza-Serrano et al., 2019**).



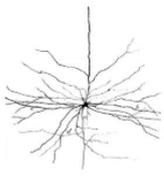
Otro subtipo microglial es la denominada microglía asociada a la región proliferativa (PAM, del inglés *Proliferative-region-associated microglia*) la cual se ha asociado a la eliminación de oligodendrocitos postnatales durante la mielinización (**Stratoulías et al., 2019**) y a la neurogénesis (**Artegiani et al., 2017; Li et al., 2019; Safaiyan et al., 2021**). A nivel morfológico se presenta en estado ameboide con ramas primarias más gruesas y cuerpo celular más grande en comparación con la microglía clásica. Es un subtipo altamente fagocítico y, al contrario que la microglía DAM, no depende del receptor TREM2 (**Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017**).

Volviendo a la microglía satélite descrita por Río-Hortega, aún se desconoce si representa un estado de transición de microglía de “vigilancia” o si presenta diferencias intrínsecas para ser consideradas como subtipo, debido a la falta de marcadores específicos y de análisis transcriptómicos. Si bien es cierto que podemos identificarla debido a la presencia de su soma asociado a la porción del axón donde se inicia los potenciales, con preferencia a las neuronas excitatorias (**Baalman et al., 2015**).

El uso de microscopía electrónica (EM) permitió identificar una población microglial estructuralmente distinta, la denominada microglía "oscura" (en inglés *Dark microglia*). Estas células, a diferencia de la microglía típica, muestran marcadores de estrés oxidativo como un citoplasma y nucleoplasma condensado, denso en electrones, lo que les da una apariencia oscura en EM, acompañado de dilatación del retículo endoplásmico/aparato de Golgi, alteración mitocondrial y una pérdida completa del patrón de heterocromatina (**Bisht et al., 2016; Hui et al., 2018a**). Si bien, la importancia fisiológica de estas microglías oscuras aún no se ha dilucidado, parecen ser extremadamente activas (**Stratoulías et al., 2019**). Otra característica distintiva de estas células es su frecuente asociación con capilares (**Bisht et al., 2016**), lo que podría sugerir una posible implicación en la remodelación vascular o en el mantenimiento de la BHE. Durante las primeras dos semanas postnatales, cuando la poda sináptica es más pronunciada, la microglía oscura es más abundante y regula a la baja IBA1, CX3CR1 y P2RY12, pero expresa fuertemente CD11b (**Stevens et al., 2007; Schafer et al., 2012**) lo que se asocia a la poda sináptica.

I.5 FUNCIONES DE LA MICROGLÍA EN EL SNC

Durante décadas, el cerebro ha sido considerado un órgano inmunoprivilegiado protegido de la periferia por la BHE que evitaba el paso de la mayor parte de las moléculas de la circulación general al parénquima cerebral. Sin embargo, en los últimos años se ha observado que la comunicación del SNC con la periferia es más fluida de lo que se pensaba (**Sharon et al., 2016**).



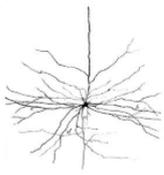
INTRODUCCIÓN

Como mecanismo de defensa del SNC, la microglía se ha estudiado clásicamente en el contexto de respuestas inmunes, actuando como sensores del daño, examinando su entorno constantemente en búsqueda de señales o estímulos que puedan alterar la homeostasis cerebral (**Nimmerjahn et al., 2005; Wlodarczyk et al., 2017**).

Esta capacidad defensiva es gracias a la gran variedad de receptores que expresa la microglía, ubicados principalmente en la membrana, capaces de detectar estímulos potencialmente nocivos, en particular los DAMPs y los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs del inglés *pathogens associated molecular patterns*). Estos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs del inglés *pattern recognition receptors*) incluyen, entre otros, receptores de tipo toll (TLR, del inglés *Toll-like receptor*), receptores similares al dominio de oligomerización de unión a nucleótidos formadores de inflammasomas (NLR, del inglés *nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*) y receptores de activación expresados en células mieloides (TREM) (**Shen et al., 2018**). La interacción entre ligando y receptor desencadena una respuesta inflamatoria (**Hennesy et al., 2010**) e inducen cambios transcripcionales que rigen la respuesta y el fenotipo de la microglía (**Chen y Nuñez, 2010**). Esta respuesta tiene como resultado la liberación de factores inflamatorios como la interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6, el factor de necrosis tumoral α (TNF α , del inglés *tumour necrosis factor α*), la ciclooxigenasa-2 (COX2), el ácido nítrico óxido sintasa 2 (NOS2, del inglés *nitric acid oxide synthase 2*) y especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) (**Chao et al., 1950**). Esta respuesta inflamatoria aguda promueve a su vez, la activación de la respuesta fagocítica por parte de la microglía con el objetivo de eliminar las neuronas dañadas y agregados neurotóxicos y, así, mantener la homeostasis y evitar el daño (**Colton y Gilbert., 1987; Hanisch y Kettenmann., 2007; Neumann et al., 2009; Ransohoff et al., 2009; Prinz et al., 2011; Fricker et al., 2012; Codolo et al., 2013; Brown et al., 2014; Herzog et al., 2019, Jurga et al., 2020**).

Su capacidad fagocítica y de inducción de muerte es especialmente relevante en el cerebro en desarrollo, donde, en regiones específicas las neuronas en apoptosis liberan señales de “find-me” que permite el reclutamiento de las células microgliales. Alcanzado el destino se desencadenan señales “eat-me” para estimular la fagocitosis (**Mosser et al., 2017**).

Durante la embriogénesis se forman cantidades excesivas de neuronas, muchas de las cuales experimentan muerte celular programada (**Yeo y Gautier, 2004**). En este sentido, la microglía se encarga de la eliminación de restos celulares del cerebro en desarrollo actuando como fagocitos "profesionales", conocidos por su capacidad rápida y eficiente de eliminar células muertas y restos celulares (**Sierra et al., 2016**). Sin embargo, además de su actividad fagocítica, la microglía puede participar activamente en promover la apoptosis, especialmente en zonas de neurogénesis activa, siendo capaz de regular el número de células progenitoras

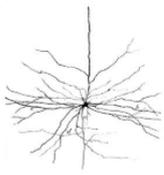


INTRODUCCIÓN

neurales (NPC, del inglés *Neural Progenitor Cell*) (**Schafer y Stevens, 2015; Frost y Schafer, 2016**). Por tanto, la microglía es capaz de liberar señales de muerte celular (**Frade y Barde.,1998; Marín-Teva et al., 2004**), así como fagocitar sin necesidad de inducir apoptosis durante la embriogénesis (**Cunningham et al., 2013**). El inicio de la apoptosis mediada por la microglía puede ser desencadenado mediante la secreción de factores solubles como el factor de crecimiento neural (NGF, del inglés *nerve growth factor*), TNF α , la producción de ROS, así como por señales mediadas por contacto como en el caso de la integrina CD11b y la señalización del inmunorreceptor DAP12 (**Han et al., 2017**). Además, la microglía puede colonizar las zonas proliferativas corticales donde pueden fagocitar las NPC, controlando así la producción de neuronas y macroglía en la corteza cerebral en desarrollo (**Cunningham et al., 2013**).

Frente a esta visión clásica de la microglía como células inmunitarias residentes “en reposo” que tan solo se activan y comienzan a fagocitar y a secretar cito y quimioquinas en respuesta a desencadenantes patológicos, evidencias recientes muestran que la microglía son células altamente dinámicas. Ahora se acepta que las funciones gliales son mucho más complejas de lo que se describió inicialmente. La microglía está activamente involucrada en muchos aspectos del SN, tanto en desarrollo como en adulto, como la neurogénesis y plasticidad, la reparación de la mielina, la angiogénesis, el cableado sináptico y el mantenimiento de los circuitos neuronales. Así mismo, son necesarias para la supervivencia (**Schafer y Stevens., 2015; Jurga et al., 2020**) gracias a la producción de factores tróficos, mitogénicos y antiinflamatorios críticos para la supervivencia, proliferación y maduración de NPC en el cerebro en desarrollo (**Frost y Schafer., 2016**). Por lo tanto, el funcionamiento apropiado de la microglía es de gran importancia para el SNC tanto en situación fisiológica como patológica (**Han et al., 2017**). Desde las etapas embrionarias, la microglía desempeña funciones esenciales más allá de las funciones inmunes. El desarrollo embrionario representa un proceso enormemente dinámico que requiere coordinación y comunicación entre sistemas de órganos y tipos de células diferentes. En el SNC, una gran variedad de neuronas y células gliales deben comunicarse entre sí para lograr la exquisita estructura y función que son características del SN maduro (**Frost y Schafer., 2017**). Trabajos recientes demuestran que, entre otras células, la microglía regula una serie de procesos de desarrollo que son necesarios para lograr la arquitectura celular y funciones adecuadas en el SNC maduro (**Frost y Schafer., 2017**).

La vasculatura del cerebro se desarrolla exclusivamente a través de la angiogénesis, durante la cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes (**Reemst et al., 2016**). En el cerebro este proceso comienza alrededor de E9.5, periodo durante el cual se produce la invasión de los brotes vasculares al neuroepitelio seguido por ramificación, arborización y migración de brotes capilares hacia los ventrículos donde los factores

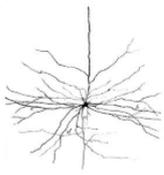


INTRODUCCIÓN

angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) está altamente expresado. Debido a la observación de microglía previamente al desarrollo de los vasos sanguíneos (**Frost y Schafer., 2016**), se ha sugerido su implicación no solo en la formación de nuevos vasos sanguíneos sino también, con el proceso de establecimiento de redes vasculares (**Arnold y Betsholtz, 2013; Reemst et al., 2016**). Está implicada en la secreción de factores tróficos como el factor de crecimiento insulínico 1 (IGF1, del inglés *insulin-like growth factor 1*), el factor 1 estimulante de colonias del factor de crecimiento (CSF1, del inglés *growth factor colony-stimulating factor 1*) así como otros factores de crecimiento (**Ueno y Yamashita, 2014**). Se cree que CSF1 y su receptor (CSF1R) regulan el mantenimiento y la supervivencia no solo de la microglía sino también, de nuevas neuronas (**Ginhoux et al., 2010**). La participación de CSF1-R en la regulación y supervivencia tanto de la microglía como de las neuronas aboga por un papel crucial de la señalización de CSF1-R/CSF-1 mediada por microglía en el desarrollo cerebral adecuado (**Reemst et al., 2016**), lo que va de la mano de la elevada expresión de CSF1R durante el desarrollo del cerebro (**Bulloch et al., 2008**).

Además de las neuronas, la microglía durante el desarrollo se ha visto implicada en la supervivencia, proliferación y/o diferenciación de otros tipos de células residentes como las NPC o las células precursoras de oligodendrocitos (OPC, del inglés *oligodendrocyte precursor cells*) a través de varios factores secretados tales como IL-6, el factor inhibidor de la leucemia (LIF, del inglés *leukaemia inhibitory factor*), IGF-1, el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B, del inglés *nuclear factor kappa light-chain-enhancer of activated B cells*) e IL-1 β (**Schafer y Stevens., 2015; Frost y Schafer., 2016**). Durante la neurogénesis la microglía también se ve implicada activamente a través de la eliminación de progenitores neuronales, regulando de esa forma el número de células recién nacidas con el objetivo de garantizar la homeostasis, un proceso que aparentemente lleva a cabo mediante fagocitosis primaria o fagoptosis (**Luo, et al., 2016**). Todas estas evidencias sugieren que la microglía tiene el potencial de regular la formación y supervivencia, la proliferación y la maduración de la mayoría de los tipos de células SNC en desarrollo (**Frost y Schafer., 2016; Mosser et al., 2017**).

Al igual que sucede con el exceso de neuronas, durante el desarrollo temprano se forma un exceso de contactos sinápticos. Las sinapsis menos activas o disfuncionales deben ser eliminadas y se fortalecen las conexiones activas, un proceso crítico para la conectividad sináptica precisa (**Schafer y Stevens., 2015**). La microglía a través de sus ramificaciones hace contacto con dichas sinapsis, siendo las responsables de la desaparición de las ineficientes o inútiles, un proceso que se conoce como poda sináptica (**Stevens, et al., 2007; Wake, et al., 2009; Mosser et al., 2017**). Este proceso está mediado por la comunicación microglía-neurona



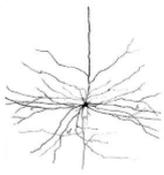
INTRODUCCIÓN

a través del receptor fractalkina CX3CR1 y del ligando neuronal CX3CL1 (**Paolicelli, et al., 2011; Hoshiko, et al., 2012**). La implicación de la microglía en la maduración y la remodelación de la conectividad sináptica está asociada a su actividad fagocítica, sin embargo, va más allá de la poda. La microglía está implicada en la formación de nuevas sinapsis gracias la secreción de neurotrofinas como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived neurotrophic factor*) (**Rigato et al., 2011; Parkhurst, et al., 2013; Frost y Schafer., 2016**), TNF α o la IL-1 β (**Mosser et al., 2017**). Una evidencia de esta función microglial es que la primera oleada de sinaptogénesis se produce en roedores alrededor del día embrionario E14, cuando la microglía son las únicas células gliales presentes. Por tanto, se ha sugerido que, en estas etapas tempranas, la microglía facilita y promueve la sinaptogénesis mediante la secreción de factores de crecimiento que favorecen no solo la sinaptogénesis sino también la supervivencia neuronal, tal y como hemos mencionado anteriormente (**Kettenmann et al., 2013; Reemst et al., 2016**). Además, esta función fagocítica se ha relacionado recientemente con el proceso de supervivencia y guía axonal indirectamente a través de la fosfoinositida-3 quinasa (PI3K), asociada a supervivencia celular, desarrollo, alargamiento y mantenimiento del axón (**Shi et al., 2003**), seguramente a través de la secreción de IGF1. Tal y como hemos mencionado con anterioridad, gracias a la gran variedad de receptores que presenta la microglía, es capaz además de controlar la maduración sináptica de manera indirecta a través de la movilización de otros tipos celulares como los astrocitos, moduladores esenciales durante el desarrollo embrionario (**Ullian et al., 2004**). En conclusión, todos estos datos sugieren la implicación de la microglía en la regulación del número, maduración y plasticidad de las sinapsis tanto en la embriogénesis como en el cerebro adulto (**Wake et al., 2009; Tremblay et al., 2010; Frost y Schafer., 2016**).

Por otro lado, la producción de neurotransmisores en exceso puede desencadenar un estado de polarización sostenido conllevando neurotoxicidad, y en este sentido, la microglía puede prevenir dicho proceso. De hecho, se ha descrito la posibilidad de su implicación en la degradación de la dopamina a través de la enzima COMT (**Redell y Dash, 2007**). Además, es importante en la neurotoxicidad mediada por el glutamato, lo que podría implicarla en los procesos de potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *Long term potentiation*) y/o la depresión a largo plazo (LTD, del inglés *Long term depression*), esenciales en el fenómeno de plasticidad sináptica asociado al aprendizaje y la memoria (**Colonna y Butovsky, 2017**).

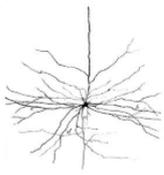
I.6 MICROGLÍA ASOCIADA A NEURODEGENERACIÓN

Si bien, como hemos mostrado anteriormente, son numerosos los papeles beneficiosos que desarrolla la microglía durante la embriogénesis y la adultez, evidencias crecientes indican



INTRODUCCIÓN

que la desregulación de la microglía puede desencadenar estados de activación sostenida (**Lehnardt et al., 2007; Bogie et al., 2014**). La creciente evidencia involucra la activación sostenida de la microglía proinflamatoria, así como la liberación de mediadores por encima de la duración habitual, en la patogénesis de distintas enfermedades infecciosas, isquémicas, traumáticas y neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer o Parkinson (**Lehnardt et al., 2007; Neher y Brown., 2007; Kavanagh et al., 2015**). Unos de los elementos comunes en diversas enfermedades neurodegenerativas es la activación de la respuesta inmune innata y la neuroinflamación, hechos que pueden promover o agravar la patología. Como desencadenantes de la respuesta neuroinflamatoria tenemos, los anteriormente mencionados, DAMPs, que pueden promover un estado sostenido de inflamación que conlleva la polarización de la microglía de un estado homeostático de protección a un fenotipo de progresión de la enfermedad asociado a la liberación sostenida de mediadores proinflamatorios (**Heneka et al., 2014**), la mencionada con anterioridad microglía DAM. Las consecuencias de la activación microglial sostenida conlleva exceso de liberación de marcadores proinflamatorios que resultan citotóxicos para las células circundantes, en especial para las neuronas debido a la falta de capacidad auto regenerativa de las mismas (**Lehnardt et al., 2007; Bogie et al., 2014**), pudiendo afectar a procesos involucrados en enfermedades neurodegenerativas como en el transporte axonal, la plasticidad sináptica y la neurogénesis adulta (**Monje et al., 2003**). Las consecuencias no solo se restringen a la muerte neuronal, sino que también afecta a la propia población microglial, la microglía activa, activa a más microglía, conllevando un proceso auto-mantenido y auto-amplificado que contribuye a la muerte neuronal y la disfunción microglial. La activación sostenida tiene también efectos perjudiciales en la capacidad fagocítica de la microglía, función esencial en el engullimiento de agregados proteicos asociados a enfermedades neurodegenerativas, lo que conlleva una reducción del aclaramiento (**Cumano y Godin., 2007; Cunningham et al., 2013**). Normalmente, el fenotipo proinflamatorio está controlado y puede llegar a revertirse y silenciarse cuando deja de ser necesario, secretándose citoquinas antiinflamatorias como la IL-4 o IL-10 (**Gadani, et al., 2012; Jurga et al., 2020**). Sin embargo, la neuroinflamación sostenida restringe el suministro de factores tróficos, citoquinas antiinflamatorias y la reparación celular desarrollado por la microglía con fenotipo antiinflamatorio (**Nagatsu et al., 2005**). Por lo tanto, la modulación de la microglía con el fin de dirigir y ajustar el equilibrio de los fenotipos funcionales resulta ser uno de los mecanismos más importantes a la hora de hablar de prevención de neuroinflamación y procesos neurodegenerativos (**Herrera et al., 2005; Biber et al., 2016**).

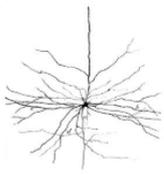


I.7 MODULACIÓN DE LA MICROGLÍA A TRAVÉS DE LAS CASPASAS

Dada la importancia biológica del papel de la microglía en los procesos neurodegenerativos, resulta de interés marcarla como célula diana para evitar, al menos, la progresión de los procesos patológicos a los que se ha ido asociando. Por ello, para su control, resulta útil evaluar las vías moduladoras de la microglía. Una de ellas se ha descubierto que viene de la mano de las Caspasas, proteínas asociadas a procesos de muerte celular programada o apoptosis.

Como mencionaremos más adelante, las Caspasas cumplen funciones más allá de las que clásicamente se les ha asociado. Un ejemplo de ello es la implicación de las Caspasas 3 y 8 en las células del sistema mieloide, incluida la microglía, asociándose al proceso de activación de la misma (**Burguillos et al., 2011**).

Estudios recientes demuestran la implicación de las Caspasas (3, 7 y 8) en la activación de la microglía y, por tanto, en la neurotoxicidad asociada (**Shen et al., 2017**), un hallazgo que, como hemos comentado con anterioridad, podría ser relevante en la aparición de enfermedades neurodegenerativas (**Burguillos et al., 2011; Kavanagh et al., 2015**). De hecho, se ha encontrado expresión citoplasmática significativa de Caspasa 3 y Caspasa 8 en microglía activa en los mesencéfalos ventrales de pacientes de enfermedad de Parkinson y Alzheimer (**Burguillos et al., 2011**). La inhibición de Caspasa 8 evitó las características típicas de la activación de microglía, incluidos los cambios morfológicos y la liberación de citoquinas proinflamatorias, lo que sugiere la existencia una vía de activación de microglía dependiente de Caspasa (**Burguillos et al., 2011**). Se ha reportado que la activación de los TLR no solo conduce a la expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria de la microglía, sino que también desencadena la activación de señales pro-apoptóticas (**Lehnardt et al., 2007**). La microglía activada muere por apoptosis una vez haya cumplido su función, con el fin de silenciarla y evitar la citotoxicidad. La vía TLR debe estar, por tanto, estrictamente regulada, no solo para la activación sino para la inducción de la muerte (**Lehnardt et al., 2007**). En este sentido entran por tanto en juego las Caspasas y su función apoptótica. Ha sido descrito que la inhibición de la Caspasa 8 supone la muerte de la microglía activada a través de los receptores TLR mediante necrosis programada o necroptosis dependiente de RIPK1/RIPK3 (del inglés *Receptor-interacting protein kinase 1-3*) (**Kim y Li., 2013**). Esta inducción de muerte tras la delección de Caspasa 8 resulta ser completamente selectiva con la microglía activa, no afectando a la microglía en reposo ni a neuronas, oligodendrocitos o astrocitos (**Kim y Li., 2013; Fricker et al., 2013**). Es por ello, que la inhibición o delección de las Caspasas podría ser una terapia prometedora en la neuroprotección del cerebro inflamado al eliminar selectivamente la microglía citotóxica (**Kim y Li., 2013; Fricker et al., 2013; Salvesen y Walsh., 2014; Kavanagh et al., 2015**).



CAPITULO II. CASPASAS

II.1 DEFINICIÓN MOLECULAR

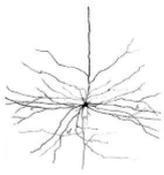
Las Caspasas son unas enzimas pertenecientes a la familia de las cisteín-aspartato-proteasas, implicadas en los procesos de muerte celular programada o apoptosis (**Oberst y Green, 2013**). Estas proteínas son sintetizadas como zimógenos inactivos, también denominados pro-Caspasas, precursores que, al recibir una señal pro-apoptótica, son convertidos a enzima activa por proteólisis de sus residuos de ácido aspártico. Dicha catálisis puede ser mediada por otra proteasa o por autocatálisis dependiendo de la naturaleza de la Caspasa en cuestión (**Kidd, 1998**).

II.2 CLASIFICACIÓN

La familia de las Caspasas puede ser clasificada por su especificidad o semejanza en la secuencia de aminoácidos, sin embargo, la manera más útil de dividir las Caspasas es desde el punto de vista funcional (**Rojas et al., 2009**). De esa forma, podemos diferenciar las Caspasas inflamatorias (Caspasas 1, 4, 5, 11 y 12) y las apoptóticas (Caspasas 2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) (**Martinon y Tschopp, 2007; Shalini et al., 2015**). A su vez, dentro de las Caspasas implicadas en la apoptosis, éstas pueden actuar como efectoras o ejecutoras del desensamblaje de la célula (Caspasas 3, 6 y 7), o como iniciadoras (Caspasa 2, 8, 9 y 10) activadas por señales de muerte, que actúan activando a los elementos efectoras en respuesta a estímulos pro-apoptóticos (**Van Opendbosch y Lamkanfi, 2019**). Las Caspasas iniciadoras son capaces de realizar autoproteólisis, lo que conlleva su transformación de zimógeno a enzima activa. Sin embargo, las Caspasas efectoras deben ser activadas mediante un corte específico mediado por las Caspasas iniciadoras (**Elinos-Báez et al., 2001**).

II.2.1 CASPASAS INFLAMATORIAS

Dentro de las Caspasa inflamatorias encontramos la Caspasa 1, la cual interviene en el procesamiento de la pro-IL1 β y la pro-IL18 en sus formas activas a través del mecanismo conocido como inflamomas (**Schroder y Tschopp, 2010**). Existen distintos inflamomas entre los que encontramos por ejemplo la familia, NLRP1 y NLRP3 o AIM2 (del inglés *Absent in melanoma 2*) (**Shalini et al., 2015**). Evidencias crecientes asocian la desregulación de algunos componentes del inflamoma con diversas enfermedades inflamatorias, y con ello, la implicación de las Caspasas englobadas en dichos mecanismos. Implicada también en el inflamoma encontramos la Caspasa 11, sugerida como activadora de la Caspasa 1 (**Wang et al., 1998**).



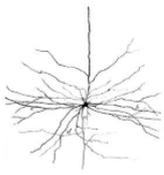
II.2.2 CASPASAS ASESINAS

Las Caspasas asesinas son aquellas implicadas en la muerte celular programada o apoptosis, proceso del que hablaremos a en el siguiente apartado. A su vez, podemos dividir las Caspasas iniciadoras o efectoras de la apoptosis. Dentro de las iniciadoras encontramos las Caspasas 2, 8, 9 y 10. Así mismo, las efectoras incluyen las Caspasas 3, 6 y 7 (**Venero et al., 2011; 2013**). Estas proteínas presentan un dominio amino-terminal de tamaño variable que es seguido de subunidades catalíticas de 20 y 10 kDa, que conforman el dominio proteasa. La mencionada clasificación se basa en la presencia o ausencia de dominios específicos de interacción proteica de la región N-terminal, lo cual está asociado a la función que llevarán a cabo. Las Caspasas iniciadoras pueden presentar bien un dominio de reclutamiento de Caspasas (CARD, en el caso de las Caspasas 1, 2, 4, 5, 9, y 11) o dominios efectores de muerte (DED, del inglés *Death effector domain*; Caspasas 8 y 10). Estos dominios median el reclutamiento y activación en complejos multiproteicos para facilitar su autoproteólisis (**Mace y Riedl, 2010**), mediada por un cambio conformacional inducido por dimerización, lo que conduce a la escisión proteolítica de las regiones que separan el predominio y las subunidades catalíticas (**Lamkanfi et al., 2002**). Las Caspasas efectoras carecen de los mencionados dominios y su activación es, por tanto, dependiente de las Caspasas iniciadoras (**Kumar, 2007; Ramírez y Salvesen, 2018**).

II.3 FUNCIONES CLÁSICAS: INICIADORAS -EFECTORAS DE APOPTOSIS

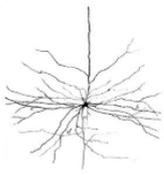
La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico irreversible altamente regulado con el fin de controlar el desarrollo y crecimiento celular desencadenado en respuesta a reacciones inmunes o daño celular (**Norbury y Hickson, 2001**). Dependiendo de dónde venga la señal de muerte, este mecanismo se puede desencadenar mediante dos vías: la extrínseca y la intrínseca. En la vía extrínseca, también denominada vía de receptores de muerte, la señal de muerte es externa a la célula, a través de ligandos que interactúan con receptores de muerte como FasR (del inglés *Fas receptor*) o TNFR1 (del inglés *tumor necrosis factor receptor 1*) (**Yamada et al., 2017**). En vía intrínseca o mitocondrial las señales de muerte provienen del interior celular como daños en el ADN o estrés celular (**Green y Llambi, 2015**).

VÍA EXTRÍNSECA: La Caspasa 8 se ha relacionado clásicamente con la función proapoptótica, como mediadora de la vía extrínseca de activación (**Salvesen y Walsh., 2014**). Dicha vía está mediada por la unión de un ligando de muerte a un receptor de membrana, denominados también receptores de muerte (DR, del inglés *death receptor*) (**Rojas et al., 2009; Fricker et al., 2013**). Son una familia de proteínas transmembrana perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, del inglés *tumor necrosis factor*) (**Rojas et al.,**



2009). Éstos, se caracterizan por poseer un dominio extracelular rico en cisteína y en su dominio intracelular citoplasmático una secuencia conocida como dominio de muerte (DD, del inglés *Death domain*) (**Ashkenazi y Dixit, 1998**), necesario para la unión a proteínas adaptadoras. Los ligandos y receptores de muerte mejor caracterizados son FasL (del inglés *Fas ligand*) / FasR, TNF / TNFR1, Apo2L (del inglés *Apoptosis-inducing ligand 2*) / DR4 (del inglés *Death receptor 4*) y Apo2L / DR5 (del inglés *Death receptor 5*). DR4 y DR5 también son conocidos como TRAILR1 y TRAILR2 (del inglés *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 y 2*) (**Chicheportiche et al., 1997; Peter y Krammer, 1998; Suliman et al., 2001; Lavrik et al., 2005; Rubio-Moscardo et al., 2005**). La unión de los ligandos a los receptores de muerte supone la activación de los mismos, desencadenando la trimerización del receptor y el reclutamiento y fosforilación de las proteínas adaptadoras intracelulares asociadas al receptor, como el factor citosólico FADD (del inglés *Fas associated death domain*) (**Elinos-Báez et al., 2001; Rojas et al., 2009**) (Figura 5). Los receptores de muerte forman complejos multiprotéicos de señalización de la muerte inducida denominados DISC (del inglés *Death-inducing signaling complexes*), que pueden contener proteínas adaptadoras. En el caso de los receptores Fas y TRAIL la proteína adaptadora FADD se une a DISC mediante su DD en C-terminal, y posteriormente, a través de su dominio efector de muerte (DED, del inglés *Death-effector domain*) del N-terminal a la pro-Caspasa 8 (**Li y Yuan, 2008; Rojas et al., 2009**). Tras el reclutamiento de la pro-Caspasa 8 se produce el procesamiento de la misma, generándose dos fragmentos catalíticos que forman la Caspasa 8 activa. Todo ello genera la activación de las Caspasas 8 y 10 y con ello, el inicio de la cascada apoptótica (**Elinos-Báez et al., 2001**). Una vez activa, la Caspasa 8 puede activar directamente a las Caspasas efectoras como la Caspasa 3 o bien, escindir a Bid para generar tBid que, tras su traslocación a la mitocondria activa la vía intrínseca (**D'Amelio et al., 2010**).

La activación de los receptores de muerte no tiene que conducir necesariamente a la muerte celular. Por ejemplo, la interacción de TNF con TNFR1 desencadena la formación de los complejos I y II (**Micheau y Tschopp, 2003**). El complejo I se forma de manera rápida e induce la expresión de proteínas anti apoptóticas como FLIP_L (del inglés *FLICE-Like inhibitory protein long*) vía NF- κ B regulando la inflamación y promoviendo la supervivencia. Este complejo está formado por TNFR1, TRADD (del inglés *Tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein*), RIP (del inglés *Receptor-interacting protein*), TRAF2 (del inglés *TNF receptor-associated factor 2*) y c-IAP1 (del inglés *Inhibitor of apoptosis 1*). El complejo II se forma a continuación e inicia la señalización pro-apoptótica. Este complejo está constituido por TNFR1, TRADD, RIP,



INTRODUCCIÓN

FADD y Caspasa 8. El balance entre el complejo I y II determinará la supervivencia o muerte de la célula (**Li y Yuan, 2008**) (Figura 5).

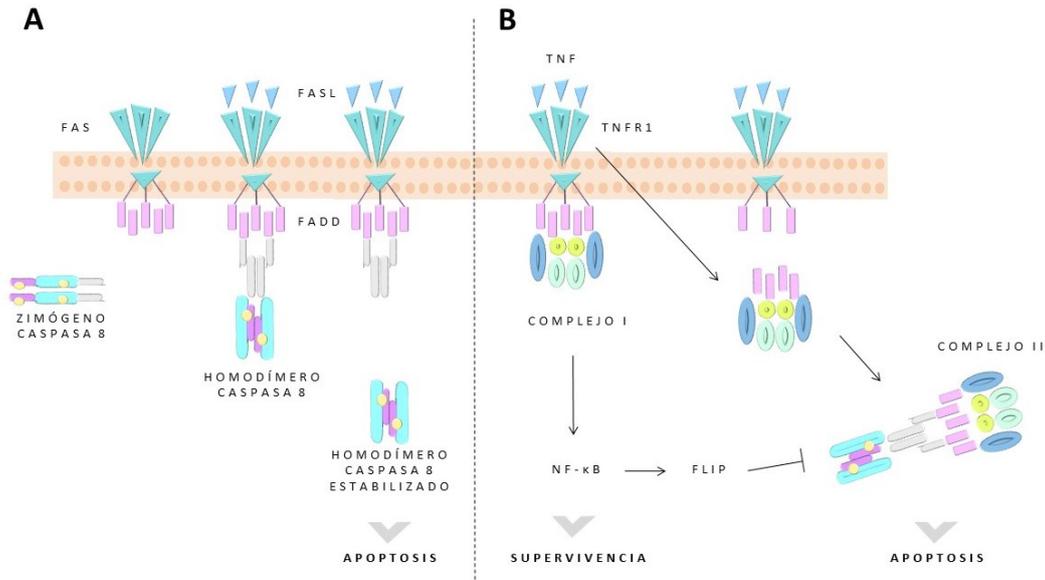
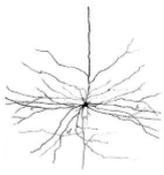


Figura 5. Proceso esquemático de activación de la vía extrínseca de la apoptosis y la formación de los complejos I y II. A) La unión de los ligandos FasL a los receptores de muerte Fas, induce la trimerización y activación del receptor. Ello desencadena el reclutamiento y fosforilación de FADD que a su vez reclutará a la Caspasa 8 provocando su homodimerización y consiguiente activación, desencadenando el inicio de la cascada apoptótica. B) Tras la unión del ligando TNF a los receptores TNFR1 se produce una formación rápida del complejo I que promueve la expresión de proteínas anti-apoptóticas como FLIP, promoviendo la supervivencia celular. Tras ello se puede formar el complejo II con la incorporación de FADD y Caspasa-8 del citoplasma iniciando la señal pro-apoptótica. Figura de elaboración propia, adaptado de (**Li y Yuan, 2008**).

Todas las Caspasas son homodímeros en su forma activa, es decir, los dos monómeros son requeridos para establecer las interacciones que estabilizan el sitio catalítico, lo que significa que provocar la heterodimerización supondría una supresión de la apoptosis (**Salvesen y Walsh., 2014**). Las Caspasas se encuentran en equilibrio entre la forma homo y la heterodimérica, aspecto en el que juega un papel esencial, c-FLIP (**Oberst y Green, 2011**), una proteína celular inhibidora que, primordialmente se ha relacionado como inhibidor de la activación de la Caspasa 8, y, por consiguiente, como regulador clave en la vía de muerte celular extrínseca, pudiendo cambiar las señales de vida o muerte (**Rojas et al., 2009**). Sin embargo, recientes descubrimientos sugieren que también es capaz de inducir la heterodimerización de Caspasa 8 y, en consecuencia, se desencadena la supresión de la necroptosis (**Yu et al., 2009**). Es en este sentido en el que se apoya el papel dual recientemente estudiado de la Caspasa 8, mediante el mecanismo del que hablaremos en apartados posteriores.

VÍA INTRÍNSECA: La regulación de la vía intrínseca viene dada por la intervención de proteínas de la familia Bcl2 (del inglés *B-cell lymphoma 2*). Estas proteínas presentes en la



INTRODUCCIÓN

membrana mitocondrial externa se dividen en pro-apoptóticas (Bak, del inglés *Bcl-2 homologous antagonist killer*; Bax, del inglés *Bcl2 associated X protein*; entre otras) y anti-apoptóticas (Bcl-2, BclX, etc.) que presentan dominios homólogos BH. Dentro del grupo pro-apoptótico diferenciamos las proteínas solo con dominios BH3 y las que presentan BH1, BH2 y BH3. Los estímulos intracelulares como el daño celular o el estrés las proteínas con solo dominio BH3 inhiben a las anti-apoptóticas (Bcl-2) y promueven la unión de los oligómeros Bak-Bax (BH1-BH3) a la membrana mitocondrial lo que permitiría la permeabilización de la membrana mitocondrial externa, y saldría al citoplasma el citocromo C y, en consecuencia, la formación del apoptosoma (**Chipuk y Green, 2008**). El apoptosoma es un complejo formado por el citocromo C, el cofactor dATP (del inglés *Deoxyadenosine triphosphate*)/ATP, Caspasa-9 y el factor de activación de la proteasa de apoptosis (Apaf1, del inglés *Apoptosis protease-activating factor-1*) (**Li et al., 1997; Zou et al., 1997; Liu et al., 1998**). Apaf1 presenta un dominio N-terminal CARD (del inglés *Caspase activation and recruitment domains*) que interactúa con el dominio CARD de Caspasa 9, la cual, tras su activación, activará también a la pro-Caspasa 3 que ejecutará el programa de muerte celular (**Qin et al., 1999; Slee et al., 1999; D'Amelio et al., 2010**) (Figura 6).

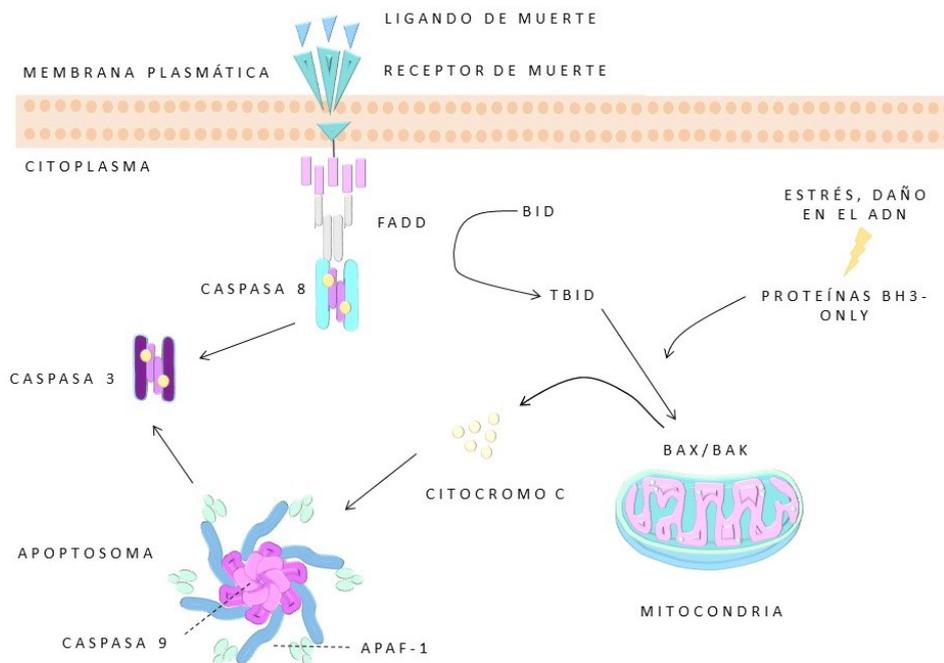
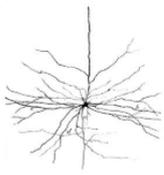
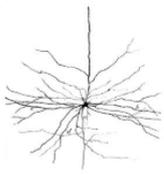


Figura 6. Proceso de activación de la vía intrínseca de la apoptosis. Una vez activa la Caspasa 8 puede activar directamente a la Caspasa 3, o bien escindir a Bid dando lugar a tBid que se traslocará a la mitocondria activando la vía intrínseca. Las proteínas Bax/Bak de la familia Bcl2 presentes en la membrana mitocondrial externa inducen la liberación de citocromo C que desencadenará la formación del apoptosoma compuesto por Apaf-1, Caspasa 9, dATP/ATP, y el citocromo C. Tras la activación de Caspasa 9 se activará la Caspasa 3 que ejecutará el programa de muerte. La presencia de proteínas con solo dominio BH3 (BH3-only) impediría la permeabilización de la membrana mitocondrial impidiendo la liberación de citocromo C, y con ello, la formación del apoptosoma. Figura de elaboración propia.



II.4 CASPASAS MÁS ALLÁ DE LA APOPTOSIS

De manera clásica las Caspasas únicamente han estado asociadas a las funciones antes mencionadas en la muerte celular programada. Sin embargo, cada vez más investigaciones respaldan sus papeles más allá de la apoptosis en procesos de inflamación, desarrollo y diferenciación celular y proliferación (*Caroline y Yuan, 2009; Hyman y Yuan, 2012; Burguillos et al., 2011; Venero et al., 2011*), en plasticidad sináptica, el aprendizaje, la memoria y el control de la activación proinflamatoria de la microglía y la neurotoxicidad asociada (*Rehker et al., 2017*). En este apartado nos centraremos en las evidencias encontradas para las Caspasas 3 y 8 en neurogénesis y desarrollo embrionario respectivamente.

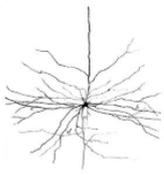


SUBCAPITULO I.I. LA IMPLICACIÓN DE CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

En el ratón, la progresión del desarrollo embrionario viene expresado convencionalmente con la edad cronológica del embrión en intervalos de medio día (0.5), comenzando por la presencia del tampón mucoso tras la cópula (día 0.5). En adelante la edad embrionaria se expresará como día embrionario (E) (*Kojima et al., 2004*).

SI.1 ETAPAS INICIALES DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

El desarrollo embrionario de mamífero comienza con la formación del cigoto totipotente durante la fertilización (E0.5) (*Edwards., 1998*) (*Figura 7*). Tras ello, el embrión experimenta sucesivas divisiones. Cada una de las células que se originan en la primera división se denomina blastómero. El primer evento morfogénético reconocible durante la embriogénesis es la compactación de los blastómeros. En este proceso se produce la formación de uniones intercelulares de los blastómeros, la polarización de las inclusiones citoplasmáticas y la especialización de la superficie celular (*Kojima et al., 2004*). A medida que los blastómeros se aplanan entre sí perdiendo la definición de célula individual, se forma una capa de células epiteliales, lo que desemboca en la formación de la mórula (*Figura 7*). La mórula es una fase muy temprana del desarrollo que se caracteriza por la formación de un grupo sólido de células provenientes de la división del cigoto (16-64 blastómeros). La presencia de un hueco en la mórula determina el fin de la fase, denominándose la nueva estructura blástula, la cual presenta una cavidad nombrada el blastocele. Como consecuencia de la entrada de líquido por activación de canales de sodio, las células más profundas quedan agrupadas en una masa celular interna, en la cual distinguimos el epiblasto, que generará el futuro embrión (*Monterde y Gil., 2012*). La blástula aumentará de tamaño y número de células dando lugar al blastocisto, donde distinguimos tres linajes celulares, el trofoectodermo (TE), el endodermo primitivo (PrE), que formarán la placenta y el saco vitelino respectivamente, y el epiblasto (EPI). Comienza la gastrulación formándose una nueva estructura denominada gástrula (*Figura 7*), en la que distinguimos tres linajes celulares germinales, el ectodermo, el mesodermo y el endodermo; células pluripotentes que van a dar lugar a los tejidos del embrión (*Kojima et al., 2004*). Tras el inicio de la gastrulación se desencadena una fase de proliferación celular acelerada y crecimiento tisular rápido.



INTRODUCCIÓN

Cada una de las capas germinales dará lugar, durante la fase de organogénesis, a los distintos órganos y componentes del embrión. La capa más externa, el ectodermo, será la responsable de la formación del SN, las vías respiratorias altas, el tubo digestivo superior, la epidermis y anexos, y las glándulas mamarias. El mesodermo será responsable de los músculos, el sistema esquelético, el sistema circulatorio y el aparato reproductor. Por último, la capa más interna, el endodermo, originará el intestino, el hígado, el páncreas, los pulmones y la mayor parte de órganos internos (*Figura 7*) (*Kojima et al., 2004., Monterde y Gil., 2012*).

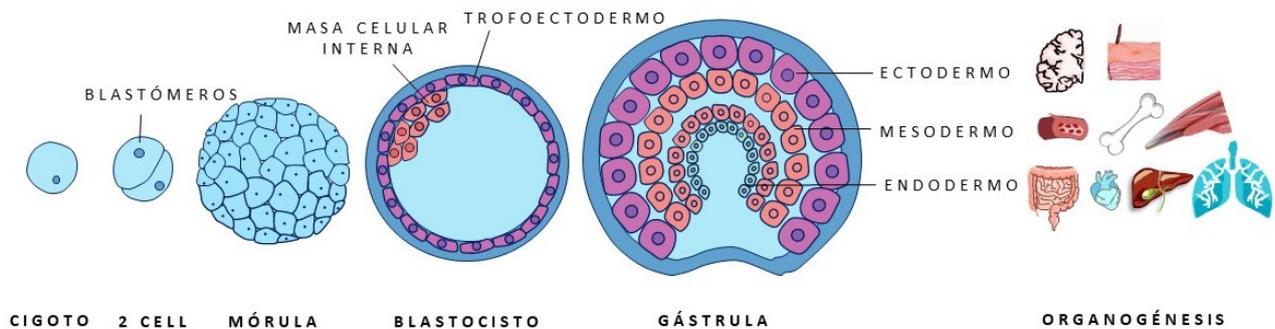
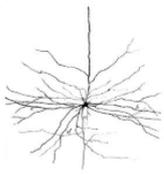


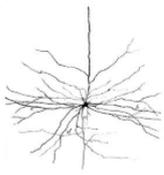
Figura 7. Proceso esquemático del desarrollo temprano del embrión. Tras la fecundación se forma el cigoto que posteriormente se divide en varias etapas dando lugar a una estructura condensada denominada mórula. La condensación de la mórula se traduce en la formación del blastocisto, donde ya encontramos diferenciada una capa celular denominada trofoectodermo y una masa celular interna polarizada. Posteriormente se forma la gástrula, la cual presenta los tres linajes celulares que darán lugar durante la organogénesis a todos los órganos y sistemas del embrión. *Figura de elaboración propia.*

Finalizada la gastrulación en torno a los días **E6.5** y **E8.5**, los somitos comienzan a diferenciarse en cada lado de la notocorda del embrión dando lugar a la columna vertebral. Durante estas fases el embrión está curvado dorsalmente en forma de “U” debido a que las líneas germinales inicialmente están invertidas, es decir, el ectodermo que formará el tubo neural y las capas superficiales está en el interior y el endodermo se encuentra en el exterior. En los días **E8.5-E9.5** comienza el fenómeno “turning” o rotación axial en el que se produce la inversión de las capas germinales, posiblemente por la necesidad de espacio para continuar su desarrollo (*Pallarés García., 2008*). En este proceso se cierra el tubo neural, aparecen las pequeñas protuberancias que corresponden a las futuras extremidades y, a día **E9.5** adquieren la forma en “C” característica del embrión vertebrado. En este estadio ya puede observarse el primordio cardíaco, se establece el mesonefros que originará los riñones y el intestino aparece bien definido. La somitogénesis se extiende desde **E8.5** hasta **E14.5** formándose 65 pares de somitos con un gradiente de maduración rostrocaudal (*Tam y Tan., 1992*). A **E10.5** se observa la primera evidencia de la formación y diferenciación del arco aórtico pulmonar, se reconoce la



INTRODUCCIÓN

arteria carótida interna, la aorta dorsal y los vasos umbilicales. Los miembros posteriores se hacen más visibles y comienza la formación del lóbulo olfatorio, la cola y la cresta urogenital. El aparato digestivo comienza a diferenciarse y se observa la apertura de la cavidad oral (**Pallarés García., 2008**). A **E11.5** los lóbulos pulmonares comienzan a diferenciarse, los ojos aparecen pigmentados, el estómago aparece dilatado y se comunica el intestino con el cordón umbilical. En el día **E12.5** se forma la cavidad acústica, se cierra la fisura nasomaxilar y se observa la interdigitación de los dedos. Comienza a diferenciarse la glándula tiroides, la faringe y los primordios pancreáticos. El hígado en este momento, ocupa gran espacio de la cavidad abdominal. A **E13.5** aparecen folículos pilosos bajo el labio, se forma la pituitaria y se observan las cuatro cámaras cardíacas. Entre los días **E14.5** y **E15.5** todo el cuerpo presenta folículos pilosos, la cabeza se eleva, el paladar se fusiona y finaliza la interdigitalización. Entre **E15.5** y el parto, en torno a **E19.5-E21.5**, el embrión aumenta de tamaño, de peso y todos los órganos van madurando. Obviamente el desarrollo continúa después del parto, sin embargo, estos primeros estadios son cruciales para la correcta formación del individuo (**Pallarés García., 2008**) (Figura 8).



INTRODUCCIÓN

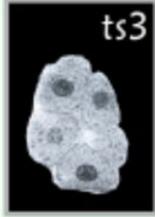
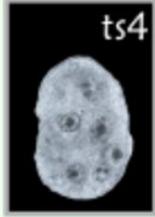
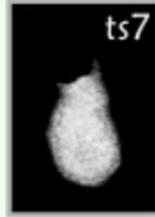
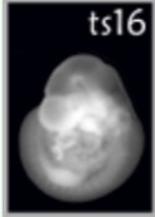
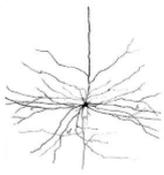
						
E1	E1	E2	E3	E4	E4.5	E5
Embrión en una célula (c).	División 2-4 c.	Mórula 4-16 c.	Blastocisto Masa celular interna 16-40 c.	Blastocisto.	Endodermo primario cubre masa interna.	Implantación y formación. Aparece cono.
						
E6	E6.5	E7	E7.5	E8	E8.5	E9
Diferenciación del embrión	Comienzo gastrulación	Inicio saco amniótico, exocoel	Placa neural, pliegues cabeza.	Primeros somitos 1-7, cierre brotes intestinales, inicio corazón.	Turning, componentes maxilares y mandibulares. 8-12 somitos.	Formación y cierre de la región anterior. 13-20 somitos.
						
E9.5	E10	E10.5	E11	E11.5	E12	E13
Formación neuróporo posterior, inicio brotes extremidades, cerebro subdividido. 21-29 somitos.	Neuroporo posterior cerrado, formación brotes extremidades posteriores, cola. 30-34 somitos.	Desarrollo tubo neural, elongación cola, comienzo hernia umbilical. 35-39 somitos.	Cierre vesículas, fosas nasales. 40-44 somitos.	Lentes vesiculares separadas del epitelio, 45-47 somitos	Inicio dedos, pigmentación retina, lengua y vesículas cerebrales diferenciadas, 48-51 somitos	Placa anterior identificada, codo, muñeca y bigotes, diferenciable hernia umbilical, 52-55 somitos
						
E14	E15	E16	E17	E18	E19	
Dedos separados distalmente, folículos, 56-60 somitos	Dedos separados, folículos pilosos, sin vibras	Reposición hernia umbilical	Piel con pliegues, hernia umbilical formada	Grandes pliegues, ojos visibles, orejas con pabellón auditivo	Nacimiento	

Figura 8. Proceso esquemático de los estadios embrionarios del embrión. TTS1-27: Estadios del desarrollo embrionario de ratón según Theiler Staging. E1-27: Estadios relacionados con los días de gestación. Tamaño guía ilustrativa sin escala. Imágenes EMAP atlas.



SI.2 DESARROLLO EMBRIONARIO- IMPORTANCIA DE LA MUERTE CELULAR

El desarrollo embrionario se caracteriza por ser un proceso de potente recambio celular. Existe mucha formación de nuevas células por lo que, para garantizar la homeostasis y el correcto funcionamiento y desarrollo del individuo, resulta esencial que el proceso de muerte celular esté altamente implicado y regulado.

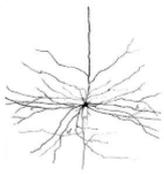
Clásicamente, la apoptosis ha sido considerada como la única forma genéticamente codificada de muerte celular, un proceso programado o regulado que conlleva reacciones inflamatorias leves, por lo que es considerado fisiológico. Sin embargo, existen otras vías de muerte celular necesarias durante la embriogénesis.

La necrosis es una muerte accidental no regulada, inespecífica y descontrolada, la cual se desencadena rápidamente en respuesta a un estrés extremo. Las células necróticas se caracterizan por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática y el colapso celular (*Kaczmarek y Vandenabeele., 2013; Belizário et al., 2015*). Debido a que la necroptosis es un tipo de necrosis, se ha venido considerando así mismo como un tipo de muerte patogénica y no regulada (*Galluzi et al., 2012*). Sin embargo, contrariamente a las creencias iniciales, no es cierto que la necroptosis sea un mecanismo no regulado e incontrolable. Se ha demostrado que la activación de RIPK1 y el ensamblaje del complejo de señalización que contiene RIPK1/RIPK3 desencadenan necroptosis programada en algunas células de manera fisiológica (*Vanlangenakker et al., 2012*). Diversos estudios atesoran el papel fisiológico de este tipo de muerte celular que puede ocurrir de manera regulada de forma similar a la apoptosis (*Galluzzi et al., 2014*).

Como hemos mencionado anteriormente, la Caspasa 8 está implicada en la apoptosis mediante la activación de la vía extrínseca. Si bien, su papel pro-supervivencia, también mencionado, se asocia a la capacidad de regular a la baja la necroptosis, ya que, a pesar de ser necesarias ambas vías de muerte, la necroptosis al compartir características con la necrosis resulta más dañina que la apoptosis. Por ello, a pesar de tener activadas ambas vías de manera fisiológica durante la embriogénesis, se requiere una mayor participación de la apoptosis debido a que ésta sucede de manera inmunológicamente silenciosa (*Orozco y Oberst., 2018*).

SI.3 MECANISMOS NECROPTÓTICOS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

Como hemos mencionado con anterioridad, la necroptosis es una vía de muerte celular programada que se asemeja fenotípicamente a la necrosis, conllevando una respuesta inmunogénica potente (*Dillon et al., 2016*). Sin embargo, a diferencia de la necrosis causada por un daño excesivo, la necroptosis está mediada por vías de transducción de señales controladas



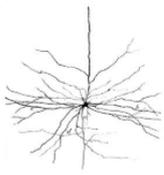
INTRODUCCIÓN

tal y como podemos observar en la figura 9 (*Figura 9*). La necroptosis se induce tras la unión de un ligando de muerte a su receptor de superficie celular, como TNFR1, CD95 o los receptores tipo toll, TLR3 y TLR4. El mecanismo molecular mejor descrito hasta la fecha fue el de unión mediada por TNF.

La necroptosis se encuentra regulada negativamente por la Caspasa 8 y depende de la actividad quinasas de RIPK1 y RIPK3. La unión de TNF a TNFR1 conduce al reclutamiento de TRADD, FADD y RIPK1 para formar el complejo I. TRAF2 se une a TRADD y recluta las ligasas E3 cIAP1 y cIAP2, que median la ubiquitinación de RIPK1. Para la activación de la necroptosis, RIPK1 requiere modificaciones postraduccionales como la desubiquitinación por parte de desubiquitilasas como CYLD. Tras su desubiquitinación, RIPK1 se libera del complejo I quedando libre en el citosol para, o bien unirse a FADD y Caspasa 8 para formar el ripoptosoma o complejo IIa, que promueve la apoptosis, o, si la actividad de Caspasa 8 disminuye y/o los niveles de FADD son bajos, unirse a RIPK3 a través de un dominio de interacción proteína-proteína conocido como el dominio de interacción homotípica RIP (RHIM del inglés *Homotypic Interaction Motif*) lo que conduce a la fosforilación y consecuente activación de RIPK3 en el Complejo IIb, también denominado necrosoma, activando con ello, la necroptosis. Una vez activada RIPK3, recluta, fosforila y activa proteína similar al dominio de la quinasa de linaje mixto (MLKL) que actúa como verdugo (**Kaczmarek y Vandenabeele., 2013; Dillon et al., 2016; Conos et al., 2017**).

De manera canónica el necrosoma se forma a través de interacción RHIM-RHIM entre RIPK1 y RIPK3, sin embargo, el dominio de interacción no solo está presente en dichas quinasas, la proteína TRIF (interferón- β inductor del adaptador que contiene el dominio TIR; proteína adaptadora aguas abajo de TLR3) por ejemplo también lo posee. Esta proteína a través de la activación de los receptores TLR3/4 puede activar a RIPK3, y con ello desencadenar necroptosis de manera independiente de RIPK1 (**Alvarez-Diaz et al., 2016; Orozco y Oberst., 2018**). De la misma manera RIPK1 puede reclutar a TRIF, provocando la inhibición de la activación de RIPK3, y con ello, inhibiendo la necroptosis (**Orozco y Oberst., 2018**).

Es importante destacar que RIPK1 además del dominio RHIM posee también un dominio de muerte (DD) a través del cual puede reclutar a FADD, a Caspasa 8 y a cFLIP. El reclutamiento de estas proteínas por parte de RIPK1 junto con la actividad de las ligasas de ubiquitina IAPs, inhibe la señalización RIPK1/RIPK3 y previene la necroptosis (**Orozco y Oberst., 2018**). RIPK1, por tanto, presenta una dualidad funcional, al encontrarse libre en el citosol puede, bien interactuar con los componentes del necrosoma y desencadenar la necroptosis o provocar la formación del complejo IIa activando la apoptosis, todo ello dependerá de los niveles y el estado de activación de Caspasa 8 y cFLIP (**Orozco y Oberst., 2018**).



INTRODUCCIÓN

Además de la inducción de la necroptosis, en ciertos contextos el necrosoma puede desencadenar la apoptosis. Este efecto depende del reclutamiento de Caspasa 8 y parece predominar cuando RIPK3 está activo o MLKL ausente, lo que conllevaría incapacidad de señalar la vía necroptótica. En este contexto RIPK3 serviría como un adaptador proapoptótico que reclutaría a RIPK1 y FADD, formando una plataforma que activaría a Caspasa 8 y con ello la apoptosis. Prueba de ello es que los animales RIPK3 se desarrollan normalmente, sin embargo, la expresión de una versión catalíticamente inactiva de RIPK3 (D161N) provoca la muerte a E11.5 por apoptosis anómala (**Orozco y Oberst., 2018**).

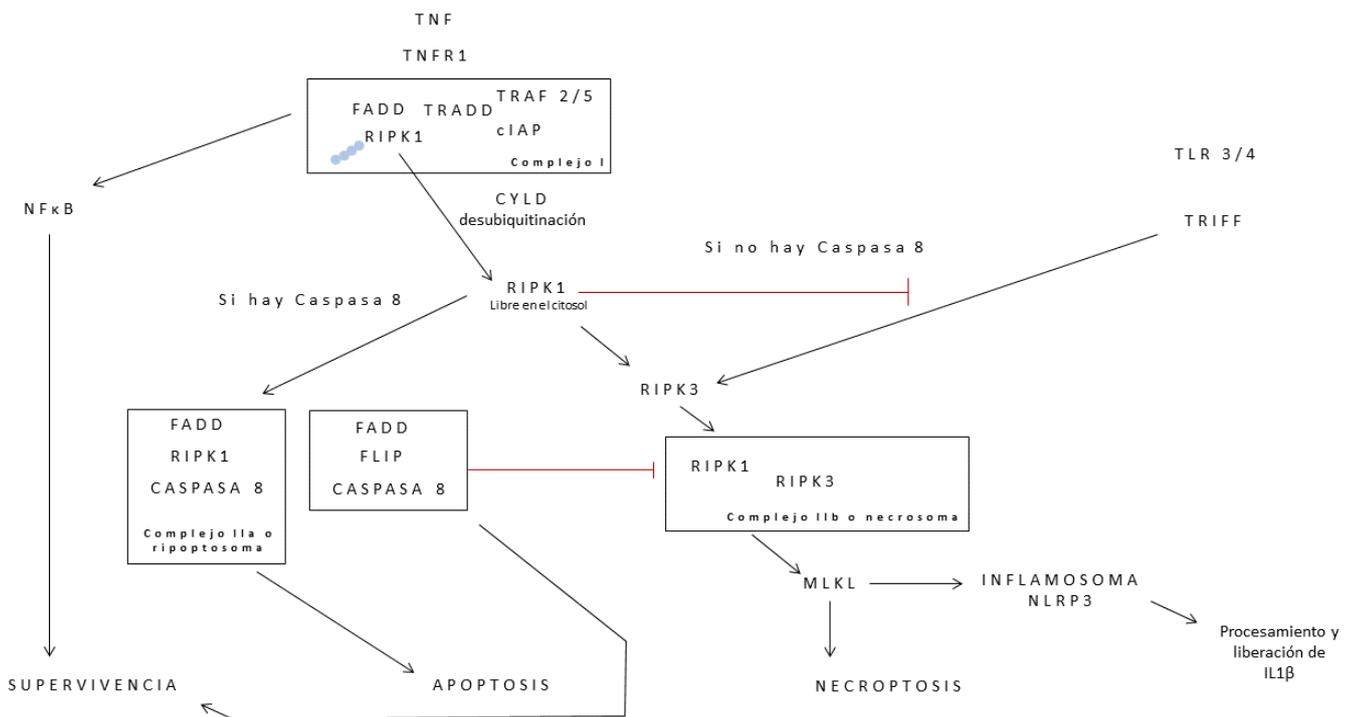
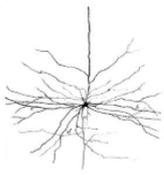


Figura 9. Esquema de muerte celular tras activación por receptor de muerte.

SI.4 CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Como acabamos de ver, existe una interacción molecular entre la apoptosis y la necroptosis que parece depender del nivel y la actividad de Caspasa 8.

Con el fin de analizar cuán necesaria es en dichos procesos durante la embriogénesis, se han ido realizando experimentos con ratones deficientes en Caspasa 8, analizando con ello, qué desenlace supondría realmente su delección. La delección homocigótica de Caspasa 8 supone la letalidad embrionaria en torno al día E10.5 de gestación. Inicialmente la muerte se atribuyó al deterioro del músculo cardíaco, la acumulación de eritrocitos y defectos en el tubo neural (**Zhang et al., 1998; Varfolomeev et al., 1998; Vandenabeele et al., 2012; Dillon et al., 2014; Kavanagh et al., 2015; Dillon et al., 2016**).



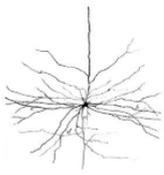
INTRODUCCIÓN

Dada la importancia biológica *per se* de la apoptosis, resulta esencial dilucidar si la letalidad ante la delección de Caspasa 8 es consecuencia de la supresión de dicha vía de muerte. Para responder a esa cuestión, Kang y colaboradores generaron animales transgénicos en los que mutaron un sitio de autoproteólisis de la Caspasa 8, haciéndola inescindible y, por tanto, incapaz de desencadenar la apoptosis, manteniendo intactas el resto de las posibles funciones asociadas a dicha proteasa (**Kang et al., 2008**). El cruce de su modelo experimental con sujetos Caspasa 8 *KO* rescató la letalidad, lo que demuestra que la función apoptótica de la Caspasa 8 no es esencial durante la embriogénesis y que, por tanto, debe tener una función prosupervivencia más allá de la muerte celular (**Kang et al., 2008**). De hecho, como funciones relevantes más allá de la apoptosis, se ha implicado en la activación de los linfocitos T y la resistencia a la necroptosis inducida por TNF- α (**Oberst y Green, 2011**). Además, diversas investigaciones han encontrado que juega un papel importante en la regulación de la inmunidad, la diferenciación celular y la determinación del destino de la célula (**Crowder y El-Deiry., 2012**).

Es digno de mención que los embriones Caspasa 8 *KO*, a simple vista, y como primera aproximación a la importancia de dicha proteasa en el desarrollo embrionario, presentan un tamaño menor, así como, *a priori*, una menor vascularización y deficiente diferenciación y conservación morfológica (**Los et al., 1999**). Así mismo, el deterioro del desarrollo del músculo cardíaco, la hemorragia masiva y el fallo a nivel endotelial, proporcionan más pruebas del papel morfogenético de las Caspasas, que pueden no solo estar asociadas con la apoptosis, sino que también se implican en otros procesos biológicos, incluyendo la proliferación y diferenciación celular tal y hemos mencionado (**Los et al., 1999; Sordet et al., 2002; Kang et al., 2004; Rébé et al., 2007**). Otras manifestaciones observadas fueron congestión severa del hígado y de los vasos de pecho y abdomen, ampliación del espacio pericárdico y adelgazamiento de la pared torácica acompañado de edema. Se observó, además, disminución de la densidad vascular en el saco vitelino (**Kang et al., 2004**).

Diversos estudios han demostrado que la ausencia de Caspasa 8 supone la letalidad embrionaria por aumento de la necroptosis, debido a la necrosis masiva provocada en consecuencia a la activación de dicha vía, la cual puede ser rescatada por la delección de RIPK1 o RIPK3 (**Vandenabeele et al., 2012; Dillon et al., 2014; Dillon et al., 2015**). Este aumento de la vía necroptótica en ausencia de Caspasa 8 supondría la muerte de los enterocitos, disrupción de la homeostasis tisular, menor capacidad de producción hematopoyética, congestión severa del hígado y de los vasos sanguíneos de tórax y abdomen, lo que conlleva la mencionada letalidad embrionaria (**Varfolomeev et al., 1998; Harriman et al., 2010; Kavanagh et al., 2015**).

Si bien son numerosas las manifestaciones patológicas presentes en los sujetos Caspasa 8 *KO* la muerte se asoció en un primer momento al deterioro del músculo cardíaco, la



acumulación de eritrocitos y defectos en el tubo neural, sin embargo, la experimentación con cultivos de embriones a E10.5 *ex vivo* mostró un retraso en la letalidad y la eliminación de los defectos del corazón y el tubo neural, lo que sugiere que estos efectos fueron secundarios a los defectos en el desarrollo de la vasculatura del saco vitelino, estructura gravemente deformada en ausencia de Caspasa 8 (*Dillon et al., 2016*). De acuerdo con esta idea se realizó deleción selectiva de Caspasa 8 en cerebro y corazón, lo cual no tuvo ningún efecto en el desarrollo. Se realizó también la deleción selectiva en hígado e igualmente no tuvo consecuencias letales (*Dillon et al., 2016*).

Es decir, si bien se ha reportado que la muerte de los sujetos Caspasa 8 *KO* es consecuencia de una mayor activación de la vía de muerte necroptótica, las investigaciones delecionando la Caspasa 8 de manera selectiva en cerebro, hígado y corazón, no causaron letalidad embrionaria. Por lo que podríamos concluir que estos tejidos no son propensos a la necroptosis y que los fallos asociados a dichos órganos en los sujetos delecionados es consecuencia, pero no causa de la muerte (*Dillon et al., 2016*).

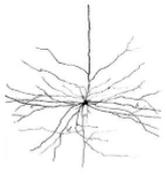
La apariencia pálida de los embriones Caspasa 8 *KO* condujo a la hipótesis de que la letalidad de estos ratones podría deberse a un desarrollo defectuoso de la sangre. El informe inicial del animal Caspasa 8 *KO* también sugirió una incapacidad para recuperar las unidades formadoras de colonias hematopoyéticas del embrión (*Kang et al., 2004*). La eliminación selectiva de Caspasa 8 en el sistema hematopoyético fue letal, aunque no se informó ni el momento ni la causa de la muerte.

Sin embargo, la deleción endotelial de Caspasa 8 genera ratones con un fenotipo similar a la deleción completa (*Varfolomeev et al., 1998*). Es sabida la estrecha relación entre dicho sistema y el hematopoyético. De tal manera resulta difícil dilucidar si el defecto de desarrollo reside en uno o ambos tejidos. Si bien, cabe destacar que existen evidencias del papel de la necroptosis en el desarrollo del sistema hematopoyético (*Dillon et al., 2016*).

En consecuencia, todo ello no hace más que mostrar la existencia de funciones no apoptóticas de la Caspasa 8, cumpliendo una función vital pro-supervivencia durante la embriogénesis, mediando la apoptosis y/o previniendo la necroptosis según el tipo de célula y el estímulo (*Zhang et al., 1998; Varfolomeev et al., 1998; Oberst et al., 2011; Fricker et al., 2013; Kavanagh et al., 2015*).

SI.5 IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 8 EN LA MICROGLÍA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

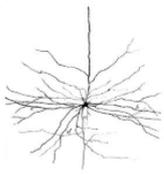
Como ya hemos mencionado, las Caspasas resultan ser una de las vías moduladoras de activación de la microglía (*Burguillos et al., 2011*). Dado los papeles esenciales de la microglía



INTRODUCCIÓN

durante la embriogénesis resulta interesante abordar la cuestión de cómo se encuentra en ausencia de Caspasa 8 durante la embriogénesis. Sabemos que la Caspasa 8 está implicada en su activación, pero ¿puede estar afectando también a la formación de microglía? ¿A la diferenciación? ¿A la migración?

Dadas las evidencias de investigaciones realizadas con la inhibición de Caspasa 8 y su efecto en la muerte vía necroptótica, sería lógico pensar que la delección de Caspasa 8 durante la embriogénesis pueda suponer la muerte de la microglía. Y no solo de la microglía, sino directamente de distintos tipos celulares esenciales para el desarrollo embrionario.



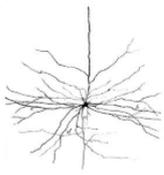
SUBCAPITULO I. II. LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 3 EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA

SII.1 NEUROGÉNESIS

Las células madre son células no especializadas que poseen dos características fundamentales, la capacidad de auto-regenerarse mediante divisiones y la de diferenciarse en células especializadas (*Navarro-Quiroz et al., 2018*). Cuando una célula madre prolifera puede sufrir dos tipos de divisiones. La división simétrica tiene como resultado la generación de dos células hijas idénticas a la madre con el objetivo de generar reservas de células madre, cumpliendo una función proliferativa. La división asimétrica, por el contrario, genera una célula hija idéntica a la madre y otra capaz de diferenciarse con el objetivo de producir nuevas neuronas (*Morrison y Kimble., 2006; Mira y Morante., 2020*). La diferenciación es el proceso mediante el cual la célula adquiere funciones específicas a través del control de la expresión, modulando vías de señalización celular que activan o silencian genes específicos que determinan el destino celular (*Leseva et al., 2015*). La capacidad de desencadenar divisiones asimétricas es lo que se conoce como potencialidad, diferenciando así, células madre totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes. Las totipotentes pueden llegar a producir cualquier célula diferenciada en el organismo y en tejidos embrionarios, como sería el cigoto o célula inicial de la embriogénesis (*Sobhani et al., 2017*). Las pluripotentes son conocidas como células madre embrionarias y pueden dar lugar a cualquier tipo celular que se encuentre en las capas germinales del embrión (*Lyssiotis et al., 2011*). Las multipotenciales, también conocidas como somáticas del adulto o células madre específicas del tejido, son aquellas que pueden dar origen a muchos tipos celulares. Las mejor caracterizadas son las hematopoyéticas de la médula ósea, que dan lugar a las células de los linajes celulares de la sangre (*Chivu-Economescu et al., 2016*) y las células madre neurales (NSC, del inglés *neural stem cells*) residentes en el SN adulto (*Homem et al., 2015*).

Las NSC son capaces de dar origen a precursores neurales multipotentes previa formación de precursores unipotenciales intermedios, neuroblastos y glioblastos respectivamente, con capacidad proliferativa limitada que, mediante neurogénesis y gliogénesis darán lugar a neuronas o células gliales (astrocitos y oligodendrocitos) respectivamente (*Navarro-Quiroz et al., 2018; Mira y Morante., 2020*).

La neurogénesis se define como el proceso en el cual, a través de diversas etapas y, modulada por múltiples estímulos fisiológicos y patológicos (*Urbán et al., 2015*), se generan



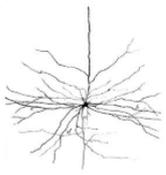
INTRODUCCIÓN

neuronas a partir de células madre que se integran en los circuitos neuronales existentes (**Niklison-Chirou et al., 2020**). Dentro de las etapas que intervienen en dicho proceso encontramos proliferación de NSC, generación de precursores con alta tasa proliferativa, formación de neuroblastos, migración, crecimiento axónico y generación del árbol dendrítico, establecimiento de sinapsis y al final: maduración a neurona madura funcional (**Navarro-Quiroz et al., 2018**).

La concepción de que la neurogénesis es un proceso exclusivo de la etapa embrionaria y postnatal temprana fue descartada en 1965 con el descubrimiento de evidencias anatómicas de neuronas recién formadas en el cerebro de ratas adultas (**Altman, 1965**). Aunque es cierto que la mayor parte de las neuronas se generan antes del nacimiento, hoy día se sabe que las nuevas neuronas son generadas continuamente por las células madre mediante neurogénesis (**Urbán et al., 2015; Navarro-Quiroz et al., 2018**). En los mamíferos adultos este proceso permanece activo en localizaciones cerebrales específicas denominadas nichos neurogénicos (**Bergmann et al., 2015**).

Para entender el proceso de neurogénesis adulta, tenemos que tener en cuenta la anatomía del hipocampo, una de las estructuras más implicadas molecularmente en dicho proceso. Anatómicamente el hipocampo comprende el cuerno de Amón (CA) que a su vez se subdivide en las regiones CA1, CA2 y CA3, y el giro dentado (GD), donde tiene lugar la neurogénesis hipocampal adulta. A nivel tridimensional se presenta como una estructura compleja cuyo eje longitudinal se dobla formando una “C invertida” y se extiende desde el septum (eje dorso-rostral) al lóbulo temporal (ventro-caudal) del cerebro (**Amaral y Witter., 1989**). El GD posee una organización en capas. La zona subventricular (SVZ, del inglés *subventricular zone*), una lámina germinal que se forma durante el desarrollo embrionario situada adyacente al epéndimo de la pared lateral de los ventrículos laterales (**Figura 10**) (**Obernier and Alvarez-Buylla, 2019**) y la zona subgranular (SGZ, del inglés *subgranular zone*) del GD del hipocampo, entre la capa de células granulares y el hilio, donde encontramos los precursores neuronales (**Figura 10**) (**Gonçalves et al., 2016**).

En el hipocampo, los precursores se diferencian cerca de su lugar de origen, mientras que en SVZ, se generan neuroblastos que tienen que migrar por la corriente rostral o, también llamada, camino migratorio rostral (RMS, del inglés *Rostral migratory stream*) hasta el bulbo olfatorio, donde pasan a ser interneuronas granulares o periglomerulares implicadas en procesos plásticos de aprendizaje olfativo (**Lazarini et al., 2014**). Si bien es cierto que se han descrito otras regiones cerebrales como posibles nichos neurogénicos, como es el caso del hipotálamo, el tronco encefálico, el cuerpo estriado, la sustancia nigra, la amígdala y



INTRODUCCIÓN

probablemente la neocorteza, resulta ser un punto controvertido y sigue en estudio (**Navarro-Quiroz et al., 2018; Denoth-Lippuner y Jessberger, 2021**).

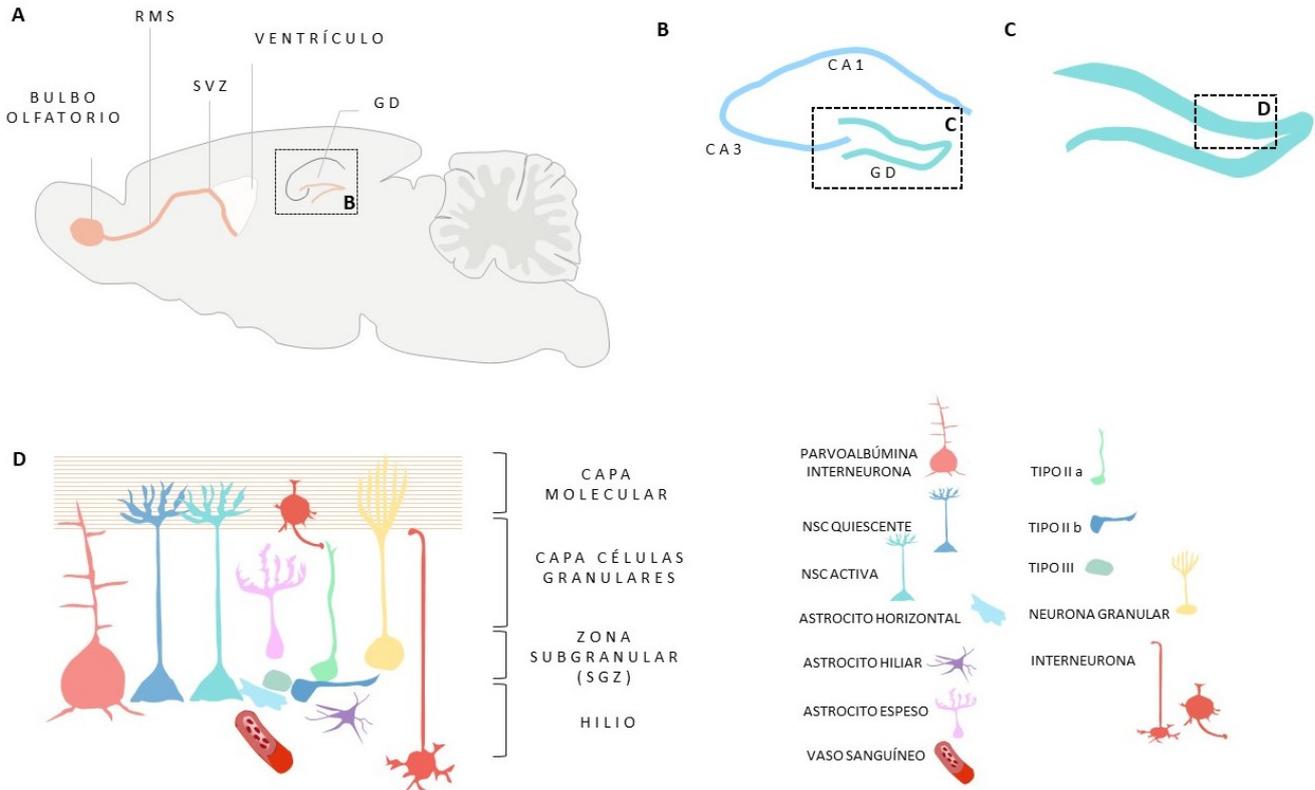
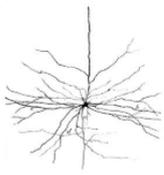


Figura 10. Neurogénesis en el hipocampo de roedores adultos. (A) Esquema de sección sagital del cerebro de ratón donde se muestran los dos nichos neurogénicos. (B) Representación del área enmarcada en A. Ampliación estructural del hipocampo adulto. (C) Representación del área enmarcada en B. Ampliación región GD. (D) Linaje neurogénico y elementos del nicho del GD. El linaje consta de NSC inactivas o quiescentes y activas (incluidos los astrocitos horizontales), IPC (tipo IIa, IIb), neuroblastos (tipo III) y neuronas granulares. Las NSC e IPC residen en la SGZ, mien tras que neuroblastos y neuronas se encuentran en la capa de células granulares. Distintos tipos de interneuronas, astrocitos y células granulares ubicados en distintas regiones del GD son partes esenciales del nicho del hipocampo adulto. Los vasos sanguíneos y las proyecciones axonales en la capa molecular contribuyen a la regulación de la neurogénesis adulta en diferentes pasos del linaje. Imagen de elaboración propia a partir de (**Urbán y Guillemot, 2014; Denoth-Lippuner y Hessberger, 2021**).

La capacidad neurogénica no solo se debe a la presencia de NSC capaces de originar neuroblastos sino también al microambiente especializado presente en los nichos neurogénicos. El nicho está compuesto por diversos tipos de células como astrocitos, neuronas, proyecciones de axones y vasos sanguíneos que facilitan el aporte de factores solubles y moléculas unidas a la membrana y a la matriz extracelular que rodea a las células. El nicho proporciona así mismo, señales que modulan el comportamiento de las NSC y ajustan la producción de nuevas células en función de las necesidades del tejido (**Blank et al., 2008; Faigle y Song, 2013**). Prueba de ello es que trasplantar precursores de la SVZ a otra zona del cerebro supone la muerte de los mismos,



INTRODUCCIÓN

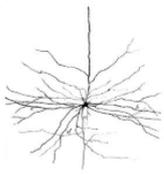
mientas que, si son trasplantadas de la SVZ de un animal a la SVZ de otro, se integran, diferencian y migran de manera correcta (**Doetsch et al., 1999; Urbán et al., 2015; Rushing y Ihrle., 2016**). Las NSC presentes en el GD, así como las denominadas células B de la SVZ, presentan ciertas características astrocíticas como la morfología ramificada con terminales que contactan con los vasos sanguíneos (**Doetsch et al., 1999; Denoth-Lippuner y Jessberger, 2021**). Además, debido a la expresión de proteínas típicamente astrocíticas como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, del inglés *glial fibrillary acidic protein*), Nestina o Sox2, hace que se las denominen como células similares a la glía radial (**Urbán et al., 2015; Moss et al., 2016**).

De manera similar a lo mencionado al inicio del apartado, las células gliales radiales en situación normal se presentan en estado inactivo y tras señalizaciones, que provocan su activación, comienzan a dividirse simétrica y asimétricamente, obteniendo respectivamente, regeneración de células gliales radiales y células progenitoras similares a glía no radial que continuarán dividiéndose hasta diferenciarse como neurona inmadura (**Pilz et al., 2018**). La generación de nuevas neuronas inmaduras es un proceso regulado por señales moleculares tanto extrínsecas como intrínsecas. Así mismo, viene acompañada de dos olas de muerte celular con el fin de garantizar el control y determinar cuáles terminarán finalmente integrándose en el circuito del GD adulto (**Denoth-Lippuner y Jessberger, 2021**). La primera ola sucede en las 24-48 horas tras la división de las células gliales radiales, la segunda a los 12-16 días, momento en el que comienza la integración sináptica, un proceso en el que la neurona inmadura recibe información dependiente del receptor NMDA con el fin de permanecer en el circuito (**Tashiro et al., 2006; Pilz et al., 2018**). Una vez formadas las neuronas maduras, se alejan de las células gliales radiales migrando radialmente hasta la capa de células granulares donde se diferencian y maduran (**Van Den Berge et al., 2013; Sun et al., 2015**). Durante estos procesos, las células van a experimentar una serie de cambios morfológicos. En primer lugar, sufren un crecimiento extenso de neuritas las cuales se van extendiendo por la capa de células granulares y los axones crecen hasta alcanzar el área CA3 del hipocampo (**Zhao et al., 2006**).

La formación de nuevas neuronas es un aspecto que está ganando mucho interés a nivel de investigación en los últimos tiempos, debido fundamentalmente a la implicación directa en los procesos de memoria (**Deng et al., 2010**). Concretamente, la integración de nuevas neuronas a nivel de circuito hipocampal confiere un grado extra de plasticidad crucial para la adquisición de ciertos tipos de memoria contextual (**Jessberger et al., 2009; Sahay et al., 2011**).

SII.2 MICROGLÍA Y NEUROGÉNESIS

Como hemos mencionado con anterioridad, la neurogénesis es un proceso altamente controlado por señales intrínsecas y extrínsecas. La proliferación, supervivencia, diferenciación



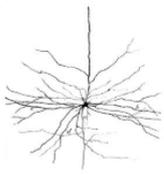
INTRODUCCIÓN

e integración de nuevas neuronas en el hipocampo adulto y el bulbo olfatorio son procesos regulados, entre otros factores, por la microglía, distribuida en el hilio dentado y en las capas SGZ y SVZ.

Cabe destacar que a microglía ubicada a lo largo del eje SVZ-RMS-OB está significativamente menos ramificada que la microglía de áreas adyacentes en ratones y ratas (*Shigemoto-Mogami et al., 2014; Ribeiro Xavier et al., 2015; Xavier et al., 2015*). Esta población expresa Clec7a exclusivamente en SGZ, uno de los genes más regulados al alza en DAM (*Keren-Shaul et al., 2017; Krasemann et al., 2017*). Este patrón restrictivo de localización sugiere la existencia de un subtipo microglial que ejerce un papel clave en la neurogénesis adulta. Recientemente ha sido descrito un nuevo tipo de microglía asociada a proliferación (PAM del inglés *proliferation-associated microglia*) la cual presenta una firma genética específica que comparte un gran número de marcadores moleculares con la anteriormente mencionada microglía DAM (*Li et al., 2019*). Esta microglía PAM se localiza en los nichos neurogénicos y presenta una maquinaria molecular implicada en la regulación de la proliferación de las neuronas de nueva síntesis. Ésta libera factores que desencadena un aumento de la producción de neuroblastos y la supervivencia de neuronas adultas (*Walton et al., 2006*). Se ha demostrado que la polarización de la microglía, así como el estado de las NSC, es esencial en la regulación de la neurogénesis (*Cacci et al., 2008; Mosher et al., 2012*). El fenotipo de la microglía determina el destino final de los precursores neuronales, de manera que la liberación de IFN γ desencadenaría una estimulación de la neurogénesis mientras que IL4 promovería oligodendrogénesis (*Butovsky et al., 2006*). Sin embargo, la microglía puede desempeñar a su vez un papel perjudicial en la neurogénesis en condiciones patológicas a través de la liberación excesiva y crónica de citoquinas proinflamatorias como IL1 β , IL6 y TNF α como consecuencia de su activación (*Ekdahl et al., 2003; Monje and Palmer, 2003; Musaelyan et al., 2014; Shigemoto-Mogami et al., 2014*).

Se ha sugerido, además, que la microglía inhibe la proliferación de las NSC del hipocampo, debido a que su número se correlaciona de forma inversa con la neurogénesis del hipocampo adulto (*Gebara et al., 2013; Appel et al., 2018*).

Cómo ya mencionamos con anterioridad, la microglía cumple con funciones fagocíticas eliminando las neuronas inmaduras apoptóticas durante la ruta de maduración a lo largo del GD. Sin embargo, la microglía fagocítica no actúa meramente eliminando los desechos. Se ha demostrado que desencadena un programa transcripcional coordinado que implica genes metabólicos y remodelados de cromatina, lo que sugiere reprogramación a largo plazo que afectaría a diversas funciones microgliales relacionadas con la modulación de la neurogénesis (*Diaz-Aparicio et al., 2020*). La microglía fagocítica es esencial para garantizar la homeostasis de

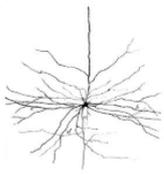


la cascada neurogénica hipocampal adulta gracias a la puesta en marcha de un circuito de retroalimentación negativa a través de su secretoma. La experimentación con ratones deficientes en receptor purinérgico P2Y₁₂ y las tirosinas quinasas de la familia TAM, Mer tirosina quinasa (MerTK)/Axl, dos vías fagocíticas, dio lugar a la interrupción de la neurogénesis tras la deficiencia crónica, mientras que la deficiencia aguda supuso un aumento transitorio de la neurogénesis (*Díaz-Aparicio et al., 2020*). Todo ello hace pensar que la microglía resulta fundamental en la neurogénesis hipocampal adulta (*Sierra et al., 2010*). Otra de las posibles funciones de la microglía durante la neurogénesis parece estar relacionada con la migración y diferenciación de las NSC, aparentemente gracias a la liberación de factores solubles liberados por las células microgliales (*Aarum et al., 2003*). Sin embargo, los mecanismos que subyacen a la regulación de la neurogénesis hipocampal por parte de la microglía aún no han sido suficientemente explorados (*Sierra et al., 2014; Vicidomini et al., 2020*), por lo que es primordial el diseño de nuevos experimentos para dilucidar el papel de los moduladores generados por la microglía y cómo se regula esta producción y liberación.

En el siguiente apartado destacaremos el papel asociado recientemente a la Caspasa-3 en la neurogénesis y en la actividad sináptica (*D'Amelio et al., 2010*), no solo como mediador esencial de la apoptosis, si no también su papel en la modulación de la microglía.

SII.3 CASPASA 3 MÁS ALLÁ DE LA APOPTOSIS

Además del papel anteriormente mencionado de la modulación de la microglía por parte de las Caspasas (*Burguillos et al., 2011*), la Caspasa 3 cumple otras funciones más allá de la apoptosis. La mitad de la población neuronal producida durante el desarrollo es eliminada con el fin de optimizar las conexiones sinápticas y eliminar las neuronas innecesarias. Dicha eliminación es llevada a cabo por apoptosis, fundamentalmente por vía intrínseca, donde la Caspasa 3 juega un papel central (*Raoul et al., 1999*). Sin embargo, la importancia de la Caspasa 3 en los procesos de neurodesarrollo va más allá de la función clásica apoptótica. De hecho, la delección de Caspasa 3 conduce a la letalidad de los sujetos en la segunda semana de vida (*Robertson et al., 2000*), además de mostrar anomalías graves en la corteza cerebral y el prosencéfalo, debido a defectos en el desarrollo del SN (*Kuida et al., 1996*). Así mismo, diversas han sido las investigaciones que asocian la inhibición de Caspasa 3 con problemas en la inducción de LTD (*Imbriani et al., 2019*). En contexto no apoptótico, se sugiere que la Caspasa 3 juega un papel esencial en la diferenciación de las NSC, así como en la autorrenovación de las mismas. La experimentación con neuroesferas clonadas del estriado de embriones E14.5 mostró que la Caspasa 3 está implicada en la neurogénesis y que esta función es independiente de la apoptosis, debido a la ausencia de activación del sustrato apoptótico de Caspasa 3, la Poli ADP ribosa

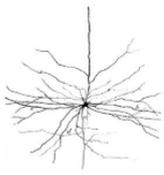


INTRODUCCIÓN

polimerasa (PARP, del inglés *Poly ADP ribose polymerase*) (**Fernando et al., 2005**). Si bien la delección de Caspasa 3 no supuso alteración de la apoptosis, si fue observada una afectación de la expresión de proteínas asociadas al proceso de desarrollo y diferenciación neural como la nestina, GFAP, la proteína básica de la mielina o la tubulina b-III. Además de la deficiencia en la diferenciación de las neuroesferas, también se observó que la inhibición de Caspasa 3 reduce la extensión de las neuritas, un proceso que sigue a la diferenciación. Por ello, la Caspasa 3 parece estar relacionada con los cambios morfológicos durante el desarrollo y diferenciación en la neurogénesis (**Fernando et al., 2005**).

La remodelación neuronal es un proceso fundamental para el desarrollo de las funciones cerebrales fisiológicas. En este contexto se ha demostrado la participación de Caspasa 3 en el proceso de *pruning* o poda dendrítica, activándose local y exclusivamente en los compartimentos dendríticos para remodelar las espinas y dendritas sin muerte celular (**Williams et al., 2006; Kuo et al., 2006**). Además, la Caspasa 3 se ha implicado en procesos de plasticidad sináptica, plasticidad asociada por primera vez a los procesos de aprendizaje y memoria por Santiago Ramón y Cajal (**Conferencia de Ramón y Cajal en The Royal Society, 1894**). La plasticidad sináptica se define como el refuerzo de las conexiones preexistentes. Las sinapsis químicas no son eventos fijos, son estructuras muy variables que pueden, en función de la actividad, presentar diverso número de receptores y canales, número de vesículas o incluso modificar la forma de la superficie de membrana del contacto sináptico. Esta capacidad de cambio es lo que se denomina plasticidad neuronal. Existen dos formas de plasticidad sináptica dependiendo de si los cambios causan potenciación o debilitamiento de la comunicación. Así encontramos la LTP y la LTD. La LTD tiene como consecuencia la disminución del tamaño de las espinas dendríticas e incluso la eliminación, debido a la desensibilización de la sinapsis ante un determinado estímulo. La LTP, definida por primera vez por Bliss y Lomo en 1973, por el contrario, desencadena fortalecimiento de las sinapsis (**Li et al., 2010**). LTP se expresa como un aumento persistente de la transmisión sináptica (**Bliss y Lomo, 1973**) y, ha sido descrita en las últimas décadas como un posible correlato celular que subyace a determinadas formas de aprendizaje (**Daoudal y Debanne, 2003; Gruart y col., 2006**). Una de las evidencias de esta hipótesis es que el uso de fármacos bloqueantes de LTP *in vitro* durante el aprendizaje, impide la adquisición de la información (**Roman et al., 1999; Martin, 2000**). Cabe destacar que LTP, bajo determinadas condiciones de estimulación puede desencadenar LTD (**Dudek y Bear, 1992**), lo que parece reflejar la existencia de mecanismos para contrarrestar el fortalecimiento sináptico por parte de las neuronas.

Diversas investigaciones han asociado a la Caspasa 3 a los procesos de LTP y LTD. Esto está apoyado por la existencia de proteínas fundamentales en la plasticidad sináptica que son



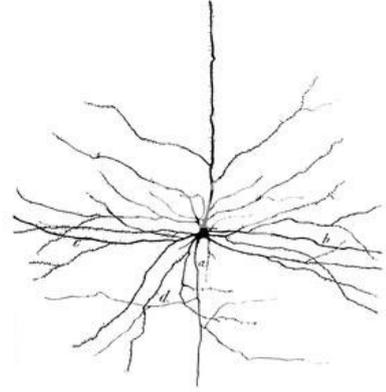
INTRODUCCIÓN

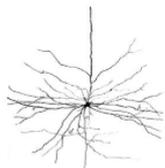
sustratos de la Caspasa 3 (**Chan y Mattson, 1999**), además de su participación tanto *in vivo* como *in vitro* en procesos de aprendizaje y memoria (**Dash et al., 2000; Stepanichev et al., 2005**).

La estimulación de LTD requiere de la activación de los receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), liberando citocromo C y activando el apoptosoma y a Caspasa 3. La Caspasa 3 activada escinde la proteína quinasa 3 Akt que elimina la inhibición de la actividad glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) esencial para la endocitosis del receptor AMPAR y la inducción de LTD (**Li et al., 2010**). En este sentido se ha planteado la posibilidad de que Caspasa 3 sea quien oriente la respuesta neuronal a apoptosis o la remodelación de la fisiología celular (**Snigdha et al., 2012**).

Tal y como hemos mencionado anteriormente, cada vez son más los estudios que refuerzan las funciones más allá de la apoptosis de las Caspasas. En este caso, la Caspasa 3 en el SNC juega un papel no apoptótico en la plasticidad sináptica (**Li et al., 2010**), fenómenos de poda (pruning) en neuronas de *Drosophila* (**Kuo et al., 2006; Williams et al., 2006**), crecimiento neurítico (**Westphal et al., 2010**), etc. Así mismo, dado el posible papel de la microglía durante la neurogénesis, hace especialmente interesante abordar la cuestión de cómo se encuentra en ausencia de Caspasa 3 durante dichos procesos.

OBJETIVOS





OBJETIVOS

Cada vez son más los estudios que avalan los papeles más allá de la muerte celular programada o apoptosis de las Caspasas asesinas, desarrollando funciones no apoptóticas en el sistema inmune mieloide y en multitud de procesos celulares, incluyendo inflamación, diferenciación y proliferación celular. Dada la importancia de estas proteasas en el neurodesarrollo o la neurogénesis, se proponen dos modelos animales, uno con una delección completa de la expresión de Caspasa 8 y el otro con una delección condicional microglial de Caspasa 3, con el objetivo de abordar los objetivos que se plantearán a continuación.

SUBCAPITULO I. I. LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

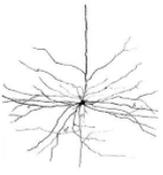
Como objetivo principal de esta parte del proyecto se planteó analizar la implicación de la Caspasa 8 en el desarrollo y migración de la microglía durante la embriogénesis. Para la consecución de este objetivo se describen a continuación los diferentes objetivos específicos:

- Generar y validar el modelo experimental murino carente de Caspasa 8.
- Estudiar la localización, mediante análisis histológico, de Caspasa 8 en el embrión en desarrollo.
- Caracterizar morfológica, funcional y molecularmente los embriones carentes de Caspasa 8 a distintas etapas de desarrollo.
- Estudiar el efecto de la carencia de Caspasa 8 en la microglía embrionaria.
- Estudiar el efecto de la delección de Caspasa 8 en el desarrollo del resto de células del SNC.
- Evaluar el estado de inflamación tras la delección de Caspasa 8.
- Estudiar la vía necroptótica en ausencia de Caspasa 8 durante la embriogénesis.

SUBCAPITULO I. II. LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 3 EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA

El objetivo principal se ha establecido en base a los antecedentes mencionados que avalan un papel esencial de la microglía asociada a los nichos neurogénicos y para el correcto funcionamiento de la neurogénesis hipocampal adulta. El objetivo principal consiste en evaluar las consecuencias de la eliminación de Caspasa 3, específicamente en la microglía, en la neurogénesis hipocampal adulta. Para la consecución de este objetivo se describen a continuación los diferentes objetivos específicos:

- Generar y validar el modelo experimental murino condicional carente de Caspasa 3 específicamente en la microglía.
- Caracterizar morfológica, funcional y molecularmente la microglía asociada a los nichos

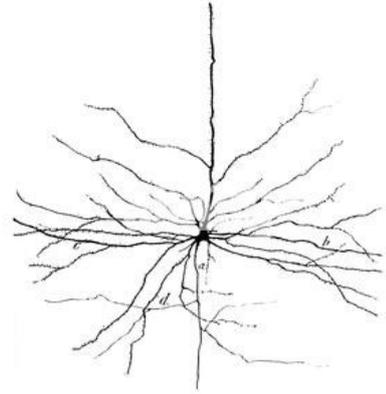


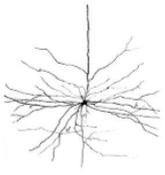
O B J E T I V O S

neurogénico en ausencia de Caspasa 3.

- Estudiar el efecto de la carencia de Caspasa 3 en la microglía en la neurogénesis hipocampal adulta y, en la integración de estas neuronas en el circuito hipocampal en condiciones normales y patológicas.
- Estudiar la proliferación de las neuronas de nueva generación y la microglía en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo en ausencia de Caspasa 3 microglial.
- Caracterizar fenotípicamente del modelo condicional microglial carente de Caspasa 3.

MATERIAL Y MÉTODOS





1 MODELOS ANIMALES

Todos los experimentos realizados 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) por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia y fueron aprobados por el comité ético científico de la Universidad de Sevilla y la Junta de Andalucía.

Los animales se mantuvieron hasta su estudio en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, a temperatura constante de 22 ± 1 °C y a una humedad relativa del 60 %, con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y libre acceso, *ad libitum*, a comida y agua.

Debido a que la presente tesis doctoral se ha realizado en base a dos líneas experimentales, las edades, sexos y el número de sujetos empleados, se especificarán en los pies de figura de los resultados para facilitar su comprensión.

A continuación, mostraremos la obtención de los sujetos experimentales de ambas líneas de trabajo.

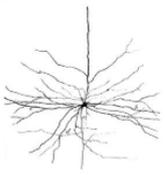
1.1 MODELO CASPASA 3^{f/f}-CX3CR1CRE

El modelo animal utilizado, es un modelo condicional que permite la supresión de la Caspasa-3 exclusivamente en las células microgliales (*Figura 11*).

Para la obtención de los ratones mutantes carentes de Caspasa 3 en la microglía se utilizó el sistema inducible Cre-LoxP, constituido por la recombinasa Cre cuyo mecanismo de acción consiste en reconocer los sitios LoxP flanqueantes a la secuencia de ADN que se desea escindir. En nuestro caso, la secuencia LoxP resulta ser el exón 2 del gen de Caspasa 3. Para la delección selectiva en microglía es necesario que la recombinasa Cre se exprese junto a un promotor específico, en nuestro caso, Cx3cR1.

Para obtener los ratones experimentales, se realizaron dos cruces. El primer cruce se llevó a cabo con ratones transgénicos *knock-in* C57BL/6 con el alelo de Caspasa 3 en el exón 2 floxeado cruzados con ratones transgénicos *knock-in* que expresan la recombinasa Cre inducible bajo un promotor específico de la microglía, Cx3cr1.

Los ratones C57BL/6 con el alelo de Caspasa 3 floxeado en el exón 2 (a partir de ahora los nombramos como Casp3^{f/f}) fueron proporcionados generosamente por el profesor Richard Flavell (Universidad de Yale). Los ratones C57BL/6 que contenían una recombinasa Cre bajo el control del promotor Cx3CR1 (a partir de ahora los nombramos Cx3cr1CreER (+/-) fueron adquiridos en *The Jackson Laboratory* (#21160, USA).



El segundo cruce se realizó entre los descendientes del primero, pero de todos ellos se utilizaron como modelo experimental los pertenecientes a la línea Cx3cr1CreER (+/-) Casp3^{f/f} mientras que el modelo control pertenece a la línea Cx3cr1CreER (-/-) Casp3^{f/f}.

El sistema utilizado es inducible por tamoxifeno, lo que nos permite determinar temporalmente la escisión del ADN, sirviendo este compuesto como ligando sintético. La inducción por tamoxifeno se consigue mediante la fusión de la recombinasa Cre con el receptor de estrógenos (CreER). En ausencia de tamoxifeno, la proteína de choque térmico (HSP90) se une a CreER impidiendo su paso al núcleo. Sin embargo, en presencia de tamoxifeno esta interacción se rompe haciendo que CreER se transloque al núcleo e interactúe con los sitios LoxP. Esto nos permite elegir cuándo inducir la actividad CreER y con ella la delección del gen flanqueado por LoxP.

Se preparó una dilución de tamoxifeno en aceite de maíz y etanol al 5% a una concentración de 2 mg/ml. La inyección de tamoxifeno se realizó a los ratones de 3-4 meses por vía intraperitoneal diariamente durante 5 días. Todos los experimentos se llevaron a cabo tres semanas después de la inyección de tamoxifeno.

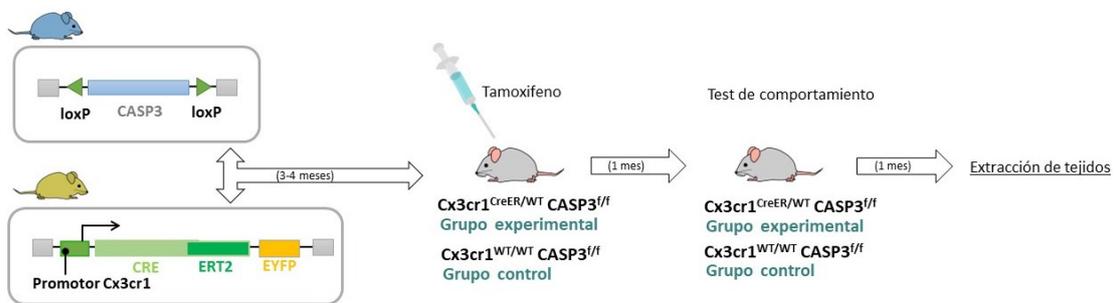
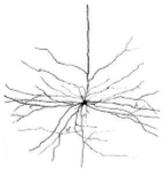


Figura 11. Generación de ratones Caspasa3Cx3cr1 condicionales y pruebas del modelo experimental. (A) Los ratones C57BL/6 con el alelo Caspasa 3 floxeado en el exón 2 fueron cruzados con ratones C57BL/6 que contenían una recombinasa Cre bajo el control del promotor de Cx3cr1 para obtener los ratones experimentales Caspasa 3^{f/f}-Cx3cr1CreER (+/-) y el control Caspasa 3^{f/f}-Cx3cr1CreER (-/-). Después de 3-4 meses inducimos la delección de la Caspasa 3 mediante la inyección de tamoxifeno. Un mes después, realizamos la prueba de comportamiento y, finalmente, procedimos a la extracción de tejido un mes más tarde.

1.2 MODELO CASPASA 8

Los animales empleados para obtener la línea carente de Caspasa 8 (a partir de ahora nombrada como Caspasa 8 KO) fueron ratones heterocigóticos de Caspasa 8 con un fondo genético C57. Estos ratones presentan uno de los alelos de Caspasa 8 delecionado (del) y el otro floxeado (flox). La importancia de contar con ratones heterocigóticos radica en la experiencia de letalidad de los individuos homocigóticos en el estado prenatal, es por ello, que para estudiar la descendencia de los cruces se hace necesario trabajar con ratones +/- heterocigóticos. La obtención del ratón heterocigoto se llevó a cabo previamente por el cruce entre sujetos TH^{Cre/+}Caspasa 8^{f/+} y ratones Caspasa 8^{f/f}. Estos ratones expresan Cre en las células germinales



además de en las catecolaminérgicas, transmitiendo así la delección a su descendencia (*Lindeberg et al., 2004*). A través de este cruce obtuvimos el ratón heterocigoto (Caspasa 8^{f/-} TH^{Cre/+}) con el exón 3 permanentemente delecionado.

El cruce dio lugar a una descendencia de embriones heterocigóticos (controles o WT) o deficientes de Caspasa 8 (*knock-out* para Caspasa 8) (*Figura 12*).

Los ratones Caspasa8^{f/f} C57BL/6 con el alelo Caspasa 8 floxeado en el exón 3 fueron proporcionados generosamente por el Prof. Steven M. Hedrick (Universidad de California, San Diego). Los ratones C57BL/6 que contenían una recombinasa IRES-Cre bajo el control del promotor de la tirosina hidroxilasa (TH) fueron amablemente proporcionados por José López Barneo (Instituto de Biomedicina de Sevilla).

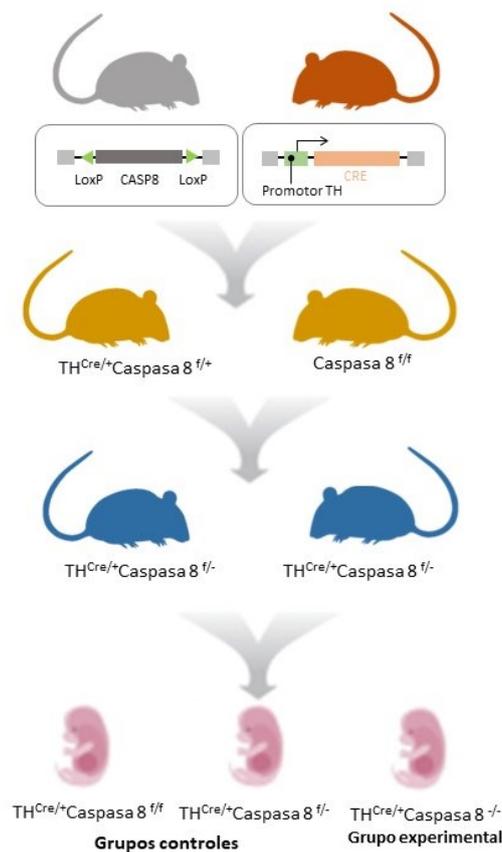
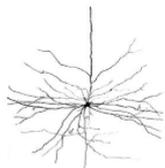


Figura 12. Generación de ratones Caspasa 8 KO. Los ratones C57BL/6 con el alelo Caspasa 8 floxeado en el exón 3 fueron cruzados con ratones C57BL/6 que contenían una recombinasa CRE bajo el control del promotor de TH para para obtener los ratones TH^{Cre/+}Caspasa 8^{f/+} que al cruzarse con ratones Caspasa 8^{f/f} generaron los ratones heterocigotos Caspasa 8^{f/-} TH^{Cre/+} necesarios para la obtención de los sujetos experimentales con ambos alelos delecionados Caspasa 8^{-/-} TH^{Cre/+}, así como los grupos control (Caspasa 8^{f/-} TH^{Cre/+} y Caspasa 8^{f/f} TH^{Cre/+}).



2 GENOTIPADO

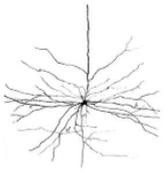
Debido a la posibilidad de diferencia de genotipo de nuestros cruces en ambas líneas, resulta esencial vislumbrar con exactitud el genotipo de cada uno de los individuos previa realización de pruebas moleculares e histológicas.

Para ello, partimos de una muestra de tejido o biopsia de cada animal. En el caso de la línea Caspasa 8 KO, se tomó una porción de cola del embrión en el momento de la extracción. En cuanto a la línea Caspasa 3^{f/f}-Cx3cr1CreER, se usaron las biopsias obtenidas de la enumeración de los ratones mediante el corte de falanges necesarias para su identificación.

El genotipado fue realizado mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR del inglés *polymerase chain reaction*) a partir del ADN extraído de las biopsias obtenidas. En primer lugar, se procedió a la extracción del ADN de los tejidos mediante el uso de 50 µl del kit de extracción de ADN QuickExtract™ DNA Extraction solution 1.0 de Epicentre por cada biopsia. Siguiendo el protocolo establecido por el fabricante realizamos una incubación a 65°C 15 min en el termociclador PTC-100 Thermal Cycler seguida de una última incubación a 98°C durante 2 min. Una vez extraído el ADN genómico se procedió a la realización del protocolo detallado por el fabricante del kit PCR MyTaq™ Red DNA Polymerase de Bioline y los cebadores correspondientes a una concentración de 10 µM (*tabla 1*). Se elaboró la mezcla de reacción compuesta por 10 µl de 5x MyTaq Red Reaction Buffer, 0,5 µl de MyTaq Red ADN polymerase, 1 µl de ADN extraído, 2 µl de cada cebador a 10 µM y 32,5 µl de agua para biología molecular (cantidad suficiente para 50 µl de mezcla total). La reacción se llevó a cabo en el termociclador PTC-100 Thermal Cycler, comenzando por un paso inicial de 1 min a 94°C seguidos de la fase de desnaturalización de 35 ciclos de 15 s a 95°C, posteriormente 15 s a 58°C fase de hibridación y finalmente la fase de extensión de 10 min a 72°C. Consecutivamente, se cargaron las muestras de PCR en un gel de agarosa al 1,5 % en tampón TAE compuesto por tris base/ácido acético/EDTA, revelándose el resultado con luz ultravioleta. Previamente a la solidificación del gel, se añadió un intercalante de ADN, RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution, que permitió la visualización de las bandas de ADN por fluorescencia en el lector FLA5100.

Tabla 1. Cebadores para genotipado líneas Caspasa 3 f/f-Cx3cr1CreER y Caspasa 8 KO.

LÍNEA CASPASA 3 CX3CRE			
Cebadores (25µM)	Cre general FW	5'-CGTTGATGCCGGTGAACGTG	Presencia o ausencia de banda a 400 pb
	Cre general RV	5'-AGCTGGCTGGTGCCAGATGG	
LÍNEA CASPASA 8 KO			
Cebadores (25µM)	Caspasa 8 flox mutant	5'-CCCAGAAATGCCAGATTCCG	400 pb
	Caspasa 8 flox common	5'-CTTGGGGCTGCCAGAATTTCTC	900 pb
	Caspasa 8 flox wild type	5'-TTACAGTCGGCCAGGCTGAC	190 pb



3 OBTENCIÓN DE LOS TEJIDOS EXPERIMENTALES

3.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y PERFUSIÓN INTRACARDÍACA DE LOS SUJETOS CASPASA 3^{f/f}-CX3R1CRE

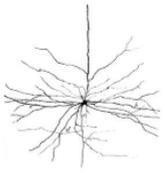
Tras la realización de las pruebas conductuales detalladas a continuación, se procedió a la extracción de los tejidos de interés de nuestro estudio. En primer lugar, se anestesiaron con 0,25ml de ketamina (domtor 1mg/ml, ketamidor 100mg/ml, nosedorm 5 mg/ml y bupaq 0,3 mg/ml). Tras ello, se les realizó una perfusión intracardiaca con una solución salina al 0,9%. Una vez completa la perfusión, se decapitaron los ratones y se les extrajeron los cerebros. Cada uno de los hemisferios se destinó a diferentes propósitos. El derecho, con el objetivo de su uso para pruebas histológicas, fue fijado con paraformaldehído 4% durante cuatro días a 4°C y seguidamente se crioprotegió en una solución de sacarosa al 30% manteniéndose a 4°C durante dos días, una vez obtenida la concentración de la disolución, el cerebro precipitó. Del izquierdo, por su parte, se separaron diversas estructuras, entre ellas el hipocampo, de las que se realizaron estudios de biología molecular. Para ello, estas estructuras fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

3.2 OBTENCIÓN DE EMBRIONES CASPASA 8 KO

Tras los cruces, se llevó a cabo un registro diario del peso de las hembras, con el fin de detectar una variación significativa que revelara el embarazo. La presencia del tampón mucoso, así como el cambio de morfología del abdomen y mamas, fueron criterios también valorados para garantizar la gestación. Tras la obtención de las hembras grávidas a distintos tiempos, se procedió al sacrificio mediante sobredosis anestésica, con el fin de obtener los embriones para su posterior estudio. Los embriones que fueron destinados a las pruebas de biología molecular fueron congelados en nitrógeno líquido y posteriormente conservados a -80°C hasta su procesamiento. Sin embargo, los destinados al estudio inmunohistoquímico se conservaron en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato a 4°C. Tras ello, se sumergieron, para su crioprotección, en sacarosa al 30% a 4°C hasta que se hundieron completamente en torno a los 2-4 días. Seguidamente se incluyeron en gelatina (100 ml agua destilada, 20 g sacarosa y 15 g de gelatina), en la misma posición hasta su corte en criostato.

4 PRUEBAS CONDUCTUALES DE LA LÍNEA CASPASA 3^{f/f}-CX3CR1CRE

Los experimentos de comportamiento se llevaron a cabo en salas de pruebas de comportamiento dedicadas durante la fase de luz estándar. Los ratones fueron llevados a una sala de espera de prueba al menos 30 min antes de la prueba de comportamiento. Todos los equipos de trabajo se limpiaron a fondo con etanol al 70% entre ensayos y el serrín no fue



cambiado durante la realización de las pruebas de conducta. Cada animal realizó las diferentes pruebas de comportamiento estableciendo un orden ascendente de estrés.

Las pruebas conductuales fueron grabadas en vídeo y posteriormente, tanto en la prueba de campo abierto como en la del laberinto en Y y reconocimiento de objetos (ORM, del inglés *object recognition memory*), se analizaron una serie de parámetros relacionados con el movimiento del ratón con el programa informático Smart® (SMART VIDEO TRACKING Software-Panlab | Harvard Apparatus).

4.1 ROTAROD

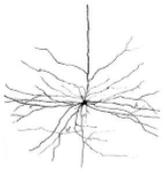
El rotarod (Ugo Basile Biological Research Apparatus, Francia) consiste en un cilindro horizontal de 3 cm de diámetro y 30 cm de longitud que puede girar a velocidad fija o acelerada de manera controlada. Los ratones se colocaron en el rotarod a una velocidad constante (5 rpm) durante un máximo de 5 min. El aprendizaje motor se evaluó también en aceleración (4-40 rpm) en 5 min. Se permitió a los ratones realizar 4 ensayos con 15 min de descanso entre ellos durante el primer día. El segundo día, se realizó una prueba final. Se registró el número de caídas y la latencia hasta la caída.

4.2 TEST EN CAMPO ABIERTO

Los ratones fueron colocados dentro de la arena de 38x15x25 cm durante 5 min permitiendo la libre exploración del terreno. Esta prueba proporciona una medida de la ansiedad, así como una medida de la actividad locomotora de los animales. En concreto, se midió el tiempo que el ratón pasaba en el borde de la arena, el tiempo de descanso y el número de veces que exploraba la región central. Estas medidas fueron medidas de forma automática mediante el programa informático indicado anteriormente.

4.3 TEST DE ENTERRAMIENTO DE CANICAS

Para esta prueba, se colocaron ratones en una arena de 20x36x14 cm con 2 cm de serrín y 12 canicas dispuestas en 3 columnas y 4 filas. Los ratones fueron colocados en la arena y se les permitió explorar libremente durante 10 min. En cada jaula se colocaron las 12 canicas de cristal en posiciones equidistantes sobre 4,5 cm de serrín. Se tomaron datos sobre el número de canicas enterradas, considerando como tales las que tenían menos del 25% de la superficie descubierta.



4.4 RECONOCIMIENTO DE OBJETOS

Se colocaron a los ratones dentro de la arena de 55×40×40 cm durante un tiempo de 5 min como modo de adaptación al entorno. A continuación, se colocaron dos objetos idénticos (A-A) permitiendo la libre exploración durante 15 min. Una hora después del entrenamiento, colocamos a los ratones en la arena con un objeto igual a uno de los anteriores (objeto constante-A) y un objeto distinto a los anteriores (objeto novedoso-B). En esta ocasión se grabará durante 10 min. 24 h después, día se colocará en la arena un objeto constante y un objeto novedoso (A-C) y se grabarán 10 min. En cada una de las sesiones se medirá el número de veces que elige cada objeto comparando la menor o mayor preferencia al objeto novedoso.

4.5 LABERINTO EN Y

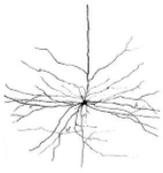
En esta prueba se utiliza un laberinto con los tres brazos iguales (8x18x38 cm). Los ratones se colocaron en el centro del laberinto al inicio de la prueba permitiendo, en primer lugar, la exploración libre durante 5 min. A continuación, se colocó una puerta bloqueando uno de los brazos y se les permitió la exploración durante 5 min. Transcurrida una hora, se retiró la puerta que bloqueaba el brazo y se permitió de nuevo, la libre exploración durante otros 5 min. En este test se mide el triplete de alternancia espontánea y el número de entradas a los brazos.

5 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARN MENSAJERO

5.1 EXTRACCIÓN DE ARN

Para la realización de esta técnica se siguió el protocolo descrito por la casa comercial con el kit de TRisure™ de Bioline (BIO-38033). Se trata de una técnica que permite aislar ADN, ARN y proteínas de una misma muestra de células o de tejidos, mediante la separación en fases. Se comenzó lisando el tejido de partida, la cabeza completa de los embriones de la línea Caspasa 8 KO e hipocampos de Caspasa 3^{fl/fl}-Cx3cr1CreER, mediante 1 ml de reactivo TRisure junto a esferas de vidrio, agitadas en un Politrón PCU Power Control Unit Drehzahlregler. De esta forma, logramos homogeneizar el tejido química y mecánicamente. Este proceso se realizó mediante repeticiones de corta duración con el fin de que la muestra no se calentara debido a la agitación, y, en consecuencia, pudiera deteriorarse.

Tras la homogeneización del tejido, se procedió a su incubación durante 5 min a temperatura ambiente, posteriormente se añadieron 0,2 ml de cloroformo por cada ml de TRisure empleado, agitando vigorosamente con el fin de favorecer la separación. A continuación, previa incubación a temperatura ambiente 3 min, se centrifugaron a 12.000 g en unas condiciones de temperatura de 4°C durante 15 min. En este momento se consiguió la esperada separación de fases gracias al cloroformo, que al ser un disolvente orgánico permite



distinguir en la parte superior la fase acuosa que contiene el ARN, una interfase, una fase orgánica donde encontraremos el ADN y un precipitado correspondiente a las proteínas.

Tras la visualización de las distintas fases, se procedió a la separación en tubos de 1,5 ml de cada una de ellas, descartando la interfase con cuidado de no llevarnos con el ARN parte de ella, evitando así la contaminación de las muestras.

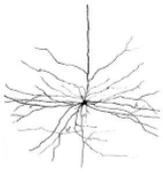
Transferida cuidadosamente la fase acuosa, se continúa con ella para el análisis del ARN mediante precipitación con Isopropil alcohol, unos 0,5 ml por cada mililitro de TRisure empleado. Mientras tanto, la fase orgánica y el precipitado, se conservan a -20°C hasta su utilización. De nuevo, tras incubar las muestras 20 min a -20°C , se centrifugaron 10 min a 4°C y 12.000 g. Una vez precipitado, descartamos el sobrenadante y se añadió al pellet 1 ml de etanol al 75% por cada ml de TRisure usado con el fin de lavar el precipitado. Posteriormente, se hicieron pasar las muestras con etanol por agitación de alta frecuencia seguido de una centrifugación a 7.500 g durante 5 min a 4°C . Se dejó secar el precipitado y se resuspendió el pellet en agua de PCR. Para la preparación del etanol al 75%, se usó agua libre de RNasa con el fin de evitar la degradación de nuestra muestra. El ARN obtenido se conservó a -20°C hasta su posterior utilización.

5.2 RETROTRANSCRIPCIÓN DEL ARN

Tras haber extraído las muestras de ARN, se midieron las concentraciones en el Nanodrop del Servicio de Biología del CITIUS II (Universidad de Sevilla) para, posteriormente preparar 11 μl de las muestras a igual concentración.

La retrotranscripción, que permite el paso de ARN a ADN complementario (ADNc), fue llevada a cabo siguiendo el protocolo técnico descrito por el fabricante mediante el kit de síntesis de ADNc de primera cadena RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis kit de Thermo Scientific™ (Thermo Scientific, K1622). Se preparó un total de 9 μl de mix por muestra formado por 5x Reaction Buffer (4 μl), RiboLock RNasa Inhibitor 20 U/ μl (1 μl), 10Mm dNTP Mix (1 μl), RevertAid M-MuLV RT 200 U/ μl (1 μl) y, por último, Primer Random Hexamer (1 μl).

A cada muestra de ARN se le adicionaron los 9 μl de Mix, quedando un volumen final de 20 μl . Seguidamente se pasó por agitación de alta frecuencia y centrifugación corta. Finalmente, se introdujeron todas las muestras en el PCT-100™ Programmable Thermal Controller MJ RESEARCH, en el programa Revertaid el cual consiste en una incubación inicial de 5 min a 25°C , otra de 60 min a 42°C y, finalmente a 70°C 5 min. El ADNc resultante del proceso se utilizó directamente para el estudio de expresión génica, pudiendo ser congelado a -80°C hasta su uso.



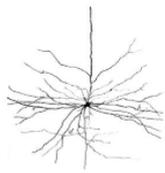
5.3 PCR CUANTITATIVA O EN TIEMPO REAL

La RT-PCR (del inglés *real time-PCR*), también denominada qPCR, se trata de una PCR de alta calidad que permite no solo la amplificación si no también, la cuantificación del ADNc previamente extraído por retrotranscripción mediante marcaje con inmunofluorescencia.

Las muestras de ADNc se diluyeron en agua para biología molecular hasta alcanzar una concentración de 5 ng/ μ l, para utilizar 42 ng de ADNc por 4,2 μ l de muestra (volumen necesario de muestra por reacción).

La RT-PCR se realizó utilizando 5 μ L de SensiFAST™ SYBR NO-ROX KIT (Bioline, Estados Unidos BIO-98020), 0,4 μ L de cada cebador y 4,2 μ L de ADNc para llegar a un volumen de reacción final de 10 μ L para una placa de 384 pocillos de LightCycler 480 Multiwell Plate 384 White con la pipeta automática E1-ClipTip™ Bluetooth™ Electronic Multichannel Pipettes. Se realizó la cuantificación por triplicado de los genes mostrados en la tabla 2 (*tabla 2a* para la línea Caspasa 3^{f/f}-Cx3cr1CreER y *tabla 2b* para la línea Caspasa 8 KO) añadiendo control de agua pura. La amplificación se realizó en un termociclador Lightcycler® 480 Instrument II (Roche) a 95°C durante 2 min seguido de 40 ciclos que consisten en una fase de desnaturalización durante 5 s a 95°C, seguida de una segunda fase de hibridación a 65°C durante 10 s, y una fase final de elongación a 72°C durante 20 s. El proceso se terminó con un paso final de 7 minutos a 72°C. El GAPDH sirvió como gen de referencia y se utilizó para la normalización de muestras. Se determinó el ciclo en el que cada muestra cruzó un umbral de fluorescencia (valor Ct) y se promediaron los valores por triplicado para cada ADNc. El valor Ct es el ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral y es posible detectarla, una vez que se alcanza la Ct, se produce la amplificación exponencial. Una primera aproximación de la concentración de ADNc es la rapidez con la que llega a la Ct, cuantos menos ciclos requiera para alcanzar la Ct, mayor será la concentración.

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



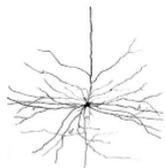
MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 2a. Cebadores empleados en RT-PCR en tiempo real en la línea Caspasa 3^{ff}-Cx3cr1Cre. Información obtenida de UniProt Consortium, 2021 <https://www.uniprot.org/>.

GEN	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA	TM (°C)
GAPDH	Marcador constitutivo	FW: GTGTTTCCTCGTCCCGTAGA RV: AATCTCCACTTTGCCACTG	60
DCX	Proteína asociada a microtúbulos. Migración e integración neurona inmadura.	FW: CCAATGCGCCGCAGCAAGTC RV: TGACAGCGGCAGGTACAGGTC	60
MertK	Tirosina Kinasa Mer. Supervivencia celular, migración, diferenciación y fagocitosis de células apoptóticas.	FW: CTGTCCAAATCCACAATGCCAC RV: GTTGACGAGGGTGCCTAATC	60
Rab7	Pequeña GTPasa que tiene un papel clave en la regulación del tráfico endolisosómico.	FW: TGCTGAAGGTCATCATCTCTG RV: AGAGACTGGAACCGTTCTTG	60

Tabla 2b. Cebadores empleados en RT-PCR en tiempo real en la línea Caspasa 8 KO. Información obtenida de UniProt Consortium, 2021 <https://www.uniprot.org/>.

GEN	DESCRIPCIÓN	SECUENCIA	TM (°C)
GAPDH	Marcador constitutivo	FW: GTGTTTCCTCGTCCCGTAGA RV: AATCTCCACTTTGCCACTG	60
CX3R	Receptor de quimiocina CX3C-1 Marcador Microglial	FW: GCCTCTGGTGGAGTCTGCGTG RV: TGGGCTTCCGGCTGTTGGTG	60
Cd11b	Integrina α M. Marcador de microglía.	FW: CCTGTTCTCTTTGATGCAG RV: GTGATGACAACCTAGGATCTT	60
DCX	Proteína asociada a microtúbulos. Migración e integración neurona inmadura.	FW: CCAATGCGCCGCAGCAAGTC RV: TGACAGCGGCAGGTACAGGTC	60
CASPASA 8	Cisteín aspartato proteasa. Caspasa inductora.	FW: GGAAGATGACTTGAGCCTGC RV: GCTCTTGTGACCTGGTCA	60
CSF1R	Microglía residente. Implicación en supervivencia de distintas células.	FW: GCTCTGATGTCTGTTCTGTG RV: GGGTGGGTGTCATTCCAAC	60
GAL3	Galectina-3. Respuesta inflamatoria.	FW: GATCACAATCATGGGCACAG RV: GTGGAAGGCAACATCATTC	60
Clec7a	Lectina de tipo C7 miembro a. Respuesta inflamatoria. Marcador de microglía asociada a daño.	FW: CTGGTATGGAAGTAAGAGACTGC RV: CGGTGAGACGATGTTGGC	60
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa Citoquina pro-inflamatoria. Muerte celular.	FW: TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC RV: GAGGCCATTTGGAACTTCT	60
IL1Beta	Citoquina respuesta inmune proinflamatoria.	FW: TGTAATGAAAGACGGCACACC RV: TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG	60



MATERIALES Y MÉTODOS

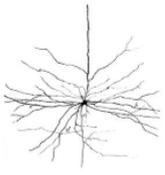
NESTINA	Promueve el desensamblaje de los filamentos intermedios de vimentina fosforilados durante la mitosis.	FW: <i>GGCAGCAACTGGCACACCTCA</i> RV: <i>GGCTGAGGACAGGGAGCACAGA</i>	60
RIPK1	Serina / treonina quinasa 1 que interacciona con el receptor. Vía muerte necroptótica.	FW: <i>GAGAAGACAGACCTAGACAGCG</i> RV: <i>GAACCTCATTGTACTCAGCGC</i>	
RIPK3	Serina / treonina quinasa 3 que interacciona con el receptor. Vía muerte necroptótica.	FW: <i>CGATGTCTTCTGTCAAGTTATGGC</i> RV: <i>CCTCCTTACCACAAACTCC</i>	
GFAP	Glial fibrillary acidic protein. Marcador astrocitos reactivos; precursor neural.	FW: <i>TCCTGGAACAGCAAAACAAG</i> RV: <i>CAGCCTCAGGTTGGTTTCAT</i>	60
MertK	Tirosina Kinasa Mer. Supervivencia celular, migración, diferenciación y fagocitosis de células apoptóticas.	FW: <i>CTGTCCAAATCCACAATGCCAC</i> RV: <i>GTTGACGAGGGTGCGTAATC</i>	60
iNOS	Óxido nítrico inducible. Marcador de respuesta inflamatoria.	FW: <i>GAGCCACAGTCCTCTTGC</i> RV: <i>CTCTCTTGCGGACCATCTCC</i>	60
TREM2	Marcador de microglía DAM.	FW: <i>GTTTCTTGACCCAGCATCC</i> RV: <i>GGGTCCAGTGAGGATCTGAAG</i>	
KI67	Marcador de proliferación celular.	FW: <i>CCTGTGAGGCTGAGACATGG</i> RV: <i>CTGTTGGCTTGCTTCATCC</i>	60
TMEM119	Proteína transmembrana 119. Función homeostática. Marcador específico de microglía.	FW: <i>CAAGGGGAAGCAGAAGGGTC</i> RV: <i>CAGGCACAGGGACTTTCAGG</i>	60

6 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA EL ANÁLISIS DE IMAGEN

Procesados previamente los tejidos de cada línea destinado al análisis histológico como hemos indicado anteriormente, se procedió al corte mediante el uso de un criostato Leica CM 1850 UV a -22°C , a un grosor de $30\ \mu\text{m}$ por rodaja. Para hacer posible el corte en criostato nos servimos del uso de OCT (Electron Microscopy Sciences) para fijar los tejidos a la platina.

Para el corte de los embriones de la línea de Caspasa 8 *KO* se requiere su inclusión previa en gelatina (100 ml agua destilada, 20 g sacarosa y 15 g de gelatina), en la misma posición hasta su corte. Los cortes de embrión de la línea Caspasa 8 *KO* fueron adheridos directamente al portaobjetos por diferencia de temperatura, debido a la tediosa manipulación de los mismos. En ambos casos, los tejidos resultantes fueron guardados a una temperatura de -20°C hasta su posterior uso.

En el caso de los cortes de cerebro de la línea Caspasa 3^{f/f}-Cx3cr1Cre se guardaron en suspensión en placas de veinticuatro pocillos con líquido anticongelante. La composición de este



consiste en: 20% del volumen total de H₂O destilada, 20% de PBS2x (Na₂HPO₄ al 5,73% y NaH₂PO₄ al 0,624% en H₂O destilada), 30% de etilenglicol y 30% de glicerol.

7 INMUNOTINCIÓN

7.1 INMUNOFLUORESCENCIA

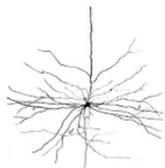
La inmunofluorescencia es una técnica que se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse específicamente con los antígenos procedentes de los tejidos estudiados. Una técnica que posteriormente permite, mediante el uso de anticuerpos marcados con fluoróforos, visualizar por fluorescencia la reacción, ya sea de manera directa o indirecta. Esta técnica es útil para estudiar la localización y expresión exacta de los antígenos en los respectivos tejidos.

Para evaluar la implicación de Caspasa 3, se estudió la presencia de microglía, su capacidad proliferativa y el estado de las neuronas inmaduras en el hipocampo utilizando diferentes anticuerpos primarios como marcadores característicos (*tabla 3a*) siguiendo el protocolo descrito previamente por (*Bachiller et al., 2018*).

En el caso de la línea de Caspasa8 *KO*, se pretendió valorar en primer lugar la presencia y localización de Caspasa 8, seguido de distintos marcajes celulares con el objetivo de valorar si la ausencia de Caspasa 8 supone un cambio tanto histológico como molecular en el embrión (*tabla 3b*).

Las secciones de tejido en cada caso se lavaron previamente con PBS 1X para eliminar el exceso de anticongelante. En el procesamiento de los tejidos embrionarios, suele ser necesario un paso previo de incubación en PBS1X a 37°C para eliminar la gelatina en la que estaban sumergidos previo corte. Posteriormente, se permeabilizaron con Tritón X-100 al 1% (v/v) en PBS (PBS-T 1%) durante 1 h, y luego se incubaron con albúmina bovina sérica (BSA: sigma aldrich #9048-46-8) al 5% (p/v) y en PBS-T 1% durante 1 h, para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos. A continuación, el tejido se incubó durante toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios a la dilución deseada en PBS-T 1% y BSA 1% (*tabla 3a* para Caspasa 3^{f/f}-Cx3cr1Cre y *tabla 3b* para Caspasa 8 *KO*).

Al día siguiente fueron lavados durante 1 h en PBS que contenía 0,1% de Triton X-100 (PBS-T 0,1%). Después se incubó durante 1 h con los correspondientes anticuerpos secundarios (*tabla 4*) en PBS-T 0,1% y BSA 1% durante 1 h en agitación suave y en ausencia de luz directa, y se volvió a lavar con PBS-T 0,1% durante 60 min. Para la tinción con Hoechst (1:4000 1µg/ml; Sigma Aldrich), las secciones se lavaron primero en PBS-T 0,1% y se incubaron durante 5 min. A continuación, se lavaron las secciones durante 60 min en PBS-T 0,1%. Las secciones cerebrales se montaron en glicerol al 50% para su visualización.



MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3a. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica para la línea Caspasa 3^{ff}-Cx3cr1Cre.

Antígeno	Dilución	Huésped	Descripción	Casa comercial	Referencia
Iba1	1:500	Cabra	Marcador de microglía	Abcam	ab5076
Iba1	1:250 (IF) 1:2000 (IHC)	Conejo	Marcador de microglía	Wako	01919741
Iba1	1:250	Ratón	Marcador de microglía	Millipore	MABN92
NeuN	1:500	Ratón	Marcador de neurona madura	Millipore	MAB377
Procaspasa-3	1:250	Conejo	Marcador de procaspasa 3	Cell Signaling	9662S
Caspasa 3 activa	1:250	Conejo	Marcador de Caspasa 3 activa	Cell Signaling	9661S
Galectina 3	1:500	Rata	Marcador de microglía DAM.	Millipore	MABT51
Galectina 3	1:500	Cabra	Marcador de microglía DAM.	R&D	AF1197
Doblecortina (DCX)	1:400 (IF) 1:1000(IHC)	Conejo	Marcador de neurona inmadura	Cell Signaling	4604S
Doblecortina (DCX)	1:250	Ratón	Marcador de neurona inmadura	Cell Signaling	4604S
Doblecortina (DCX)	1:100	Cabra	Marcador de neurona inmadura	Santa Cruz	SC-8066

Tabla 3b. Anticuerpos primarios usados en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica para la línea Caspasa 8 KO.

Antígeno	Dilución	Huésped	Descripción	Casa comercial	Referencia
Iba1	1:500	Cabra	Marcador de microglía	Abcam	ab5076
Iba1	1:1000	Conejo	Marcador de microglía	Wako	019-19741
Iba1	1:250	Ratón	Marcador de microglía	Millipore	MABN92
Caspasa-3 cleaved	1:250	Conejo	Marcador caspasa 3 activa	Cell Signaling	9661S
Clec7a	1:250	Rata	Marcador de microglía asociada a daño	Invivogen	mabg-mdect
Galectina 3	1:250	Rata	Marcador de microglía DAM.	Millipore	20/MABT51
Caspasa 8	1:250	Conejo	Marcador de Caspasa 8	Cell Signaling	4790S
Doblecortina (DCX)	1:250	Goat	Marcador de neurona inmadura	Santa Cruz	sc8066
MLKL-P	1:250	Conejo	Necroptosis	Abcam	ab196436

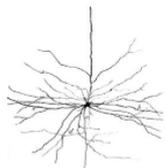


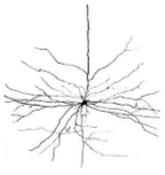
Tabla 4. Anticuerpos secundarios usados en inmunofluorescencia e inmunohistoquímica para las líneas Caspasa 3^{ff}-Cx3cr1Cre y Caspasa 8 KO.

Antígeno	Dilución	Huésped	Casa comercial	Referencia
Anti-IgG-Conejo 488	1:500	Burro	Life Technology	A21206
Anti-IgG-Cabra 546	1:500	Burro	Life Technology	A11056
Anti-IgG-Cabra 488	1:500	Burro	Life Technology	A-11055
Anti-IgG-Ratón 488	1:500	Burro	Life Technology	A21202
aAnti-IgG-Ratón 546	1:500	Burro	Life Technology	A10036
Anti-IgG-Conejo 647	1:250	Burro	Life Technology	A31573
Anti-IgG-Rata 488	1:500	Burro	Life Technology	A21208
Anti-IgG-Cabra 647	1:500	Burro	Life Technology	A21447
Anti-IgG-Ratón 647	1:500	Burro	Life Technology	A31571
Anti-IgG-Conejo 546	1:500	Burro	Life Technology	A-10040
Anti-IgG-Ratón biotinilado	1:500	Burro	Vector Laboratories	BA-9200
Anti-IgG-Conejo biotinilado	1:500	Burro	Vector Laboratories	BA-1000
Anti-IgG-Cabra biotinilado	1:500	Caballo	Vector Laboratories	BA-9500

7.2 INMUNOHISTOQUÍMICA

Esta técnica fue realizada solo en la línea de Caspasa 3^{ff}-Cx3cr1Cre. En primer lugar, se utilizó la inmunohistoquímica con Iba1 (*tabla 3a*) para la cuantificación microglial. Para los estudios se usaron series completas de medio hemisferio cerebral distinguiendo las zonas de corteza e hipocampo, y dentro de este, CA1 y GD mediante el uso de distintos anticuerpos primarios como marcadores característicos (*tabla 3a*). Las series completas de cortes flotantes de cerebro se lavaron con PBS1X para eliminar el exceso de anticongelante. Seguidamente, se incubaron durante diez minutos en 1 ml MeOH (99% MeOH y 1% H₂O₂) con el fin de inactivar la peroxidasa endógena del tejido. A continuación, se sumergieron en PBS-T 2,5% para la permeabilización del tejido. Con el objetivo de prevenir las uniones inespecíficas del anticuerpo, se incubaron los cortes durante 2 h en PBS-T al 2,5% y 5% de BSA. Tras la incubación, se añadió el anticuerpo primario a la dilución correspondiente (*tabla 3a*) en PBS-T al 2,5% y BSA 2,5%, se dejó incubando toda la noche a 4°C.

Al día siguiente, se mantuvieron durante 30 min a temperatura ambiente y después se realizaron lavados con PBS-T 2,5%. Se añadió el anticuerpo secundario biotinilado (*tabla 4*) en PBS-T 2,5% y BSA 1% y se dejó incubando durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, las muestras se lavaron en PBS1x. Seguidamente se añadió el kit ABC (Vector, PK-6100; 1%A, 1%B, 98% PBS1x) y se mantiene a temperatura ambiente durante 1 h. Se preparó una disolución de diaminobencidina (DAB), a razón de 2µl H₂O₂ por cada 2ml de DAB (Vector, SK-4100). Superado el tiempo de reacción, se realizaron lavados con PBS1X para quitar el exceso de DAB y detener la reacción. A continuación, se procedió al montaje de las muestras en portas



gelificados y se dejaron secando toda la noche a temperatura ambiente. Una vez secos, se llevó a cabo la deshidratación de los tejidos gracias a una batería de alcoholes de concentración creciente: 5 min en etanol 70%, 10 min en etanol 80%, 90%, 100%, Histolemon1 e Histolemon2 (Carlo Erba #454912). Por último, se añadió DPX (Scharlau, DP00500500) y se cubrieron con cubreobjetos para su posterior visualización.

7.3 TOMA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DE INMUNOFLUORESCENCIA

Todas las imágenes fueron adquiridas en condiciones similares (intensidades del láser y voltajes del fotomultiplicador) mediante un microscopio confocal de barrido láser con doble escáner de alta resolución y alta velocidad (ZEISS LSM 7 DUO) situado en el CITIUS, perteneciente a la Universidad de Sevilla. Finalmente, se llevó a cabo el análisis de las imágenes generadas mediante el programa de análisis de imagen gratuito Fiji ImageJ (Image Processing and Analysis in Java) descargado directamente de la página <https://fiji.sc>. Posteriormente se procesaron las imágenes, realizando en primer lugar una proyección en Z de máxima intensidad, se separaron los colores y finalmente, se realizó una mezcla de todos los marcajes.

La cuantificación de Iba1 se llevó a cabo usando la función “Cell counter” del programa ImageJ Fiji anteriormente mencionado.

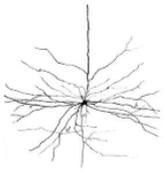
7.4 TOMA Y PROCESAMIENTO DE IMÁGENES DE INMUNOHISTOQUÍMICA

7.4.1 CUANTIFICACIÓN Y FENOTIPAJE DE MICROGLÍA

El estudio morfológico de la microglía marcada con Iba1 mediante inmunohistoquímica de la línea Caspasa 3^{ff}-Cx3cr1CreER se llevó a cabo utilizando un microscopio de campo claro (Olympus BX61) situado en el CITIUS perteneciente a la Universidad de Sevilla. Se tomaron las imágenes con el objetivo 40x en dos regiones cerebrales, corteza e hipocampo diferenciando CA1 y GD.

En primer lugar, se procedió a la cuantificación de células microgliales sin diferenciar los estados de activación. Cada recuento se realizó cinco veces en cinco regiones de interés (ROI) por sección. Se utilizaron tres secciones por animal. La media obtenida se multiplicó por el factor de conversión 23,4.

El segundo de los objetivos fue estudiar morfológicamente dicha microglía diferenciando los tres estados de activación (homeostático, reactivo y ameboide). Se llevó a cabo usando la función “Cell counter” del programa ImageJ Fiji mencionado en el anterior apartado. Se contaron los tres principales fenotipos morfológicos de microglía presentes en



función de las características morfológicas y se calculó el porcentaje de cada uno de ellos como se ha descrito *previamente* (**Carrillo-Jimenez et al., 2019**).

Finalmente, para cuantificar el porcentaje de microglía fagocítica, se creó un ROI que contenía el GD para cada imagen. Estableciendo el mismo umbral para la fluorescencia de Iba1 en cada imagen, se creó una imagen binaria. Tras un proceso de erosión, dilatación y *watershed*, se realizó un análisis de partículas. Así, se creó una biblioteca de ROIs que contenía cada microglía. La fagocitosis se definió como la formación de una bolsa tridimensional cerrada de procesos microgliales que rodean a una célula apoptótica. Las células apoptóticas se definieron en base a su morfología nuclear tras la tinción con Hoechst (Thermo Fisher Scientific) como células en las que la estructura de la cromatina (eucromatina y heterocromatina) se perdía y aparecía condensada y/o fragmentada (picnosis/cariorrhexis) (**Díaz-Aparicio et al., 2020**).

7.4.2 ESTEREOLOGÍA

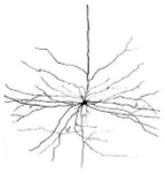
Para realizar un correcto análisis de los portaobjetos inmunohistoquímicos marcados con DCX, se utilizó la estereología siguiendo el protocolo descrito por García-Domínguez et al., (**García-Domínguez et al., 2021**). El número de neuronas DCX-positivas en el GD se estimó mediante un diseño de muestreo fraccionado utilizando el software CAST (Olympus stereology system, Melville, NY, USA) acoplado al microscopio óptico Olympus BX61.

El recuento de neuronas inmaduras se realizó a intervalos regulares con unas dimensiones predeterminadas ($x=150\ \mu\text{m}$ e $y=200\ \mu\text{m}$). En el punto de recuento se superpuso una cuadrícula de área conocida ($141,4 \times 106,0\ \mu\text{m} = 1500\ \mu\text{m}^2$) que se usó con el objetivo de $\times 40$. Así pues, la fracción del área de muestreo para cada una de las secciones fue de $1500/(150 \times 200) = 0,05\ \mu\text{m}^2$. El eje de la Z de cada sección se normalizó, por tanto, el grosor de la fracción muestreada fue de 1. De esta forma, se realizó el recuento en cortes de $30\ \mu\text{m}$ separadas entre sí $360\ \mu\text{m}$, por lo que el porcentaje de muestras analizadas fue de $30/360 = 0,08$. El número de neuronas inmaduras del GD se calculó multiplicando el número de neuronas contadas dentro de la región de conteo por la inversa de la fracción del área de muestreo y la inversa del total de las secciones contadas. Para ello, se usó de nuevo la función "Cell counter" del programa ImageJ.

8 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

8.1 EXTRACCIÓN PROTEÍNAS

El aislamiento de proteínas fue realizado mediante el uso de una disolución compuesta por RIPA 10X (Sigma R0278), inhibidores de fosfatasa y proteasas (Thermo Scientific #A32959), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA 1mM; Thermo Scientific #17892), desoxicolato de sodio



1x (Sigma D6750) y agua miliq. El volumen necesario para extraer proteínas se calcula a partir del peso del tejido. En nuestro caso, la extracción de las proteínas de los cerebros de embriones fue realizada con un volumen de 100 μ l.

Las muestras fueron sonicadas en hielo a 1 ciclo y 80% de amplitud. Tras la disgregación mecánica se procede a la centrifugación a 4°C y 14.000 g durante 20 min. El sobrenadante que contiene las proteínas fruto de la extracción realizada se transfiere a un nuevo tubo de 1,5 ml. A partir de este extracto se realiza la posterior cuantificación de proteínas totales. Las muestras fueron guardadas a -20°C hasta su utilización.

8.2 CUANTIFICACIÓN PROTEÍNAS TOTALES

La cantidad de proteína se cuantificó mediante el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific #23225 y 23227) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante para la cuantificación de proteínas en un rango de 20-2000 μ g/ml.

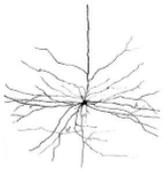
Para llevar a cabo la cuantificación es necesario la realización de una curva patrón de BSA (Sigma aldrich #9048-46-8), partiendo de un stock de 2 mg/ml. Los valores de absorbancia medidos a 562 nm en el equipo (Asys UVM 340; software MikroWin2000) fueron interpolados en la recta patrón, obteniéndose así, la concentración de proteínas en cada una de nuestras muestras.

Tras conocer la concentración de proteínas totales de cada muestra se procedió a preparar nuestra solución de carga a la misma concentración, con el objetivo de cargar la misma cantidad de proteínas totales en los pocillos (45 μ g) y poder comparar y cuantificar los resultados posteriormente.

8.3 WESTERN BLOT

La técnica Western Blot (WB) tiene como objetivo inmuno-detectar y cuantificar proteínas específicas en homogeneizados tisulares complejos, en nuestro caso, de los cerebros de embriones a E11.5. La detección se lleva a cabo mediante la movilidad electroforética, lo que depende de su tamaño.

El WB, consta de varias etapas, la primera consiste en una electroforesis, con el objeto de separar las proteínas de la muestra en función del peso molecular. Las muestras fueron igualadas a concentración de proteínas totales y mezcladas en proporción 1:1 con la mezcla de carga compuesto por 50 μ l de β mercaptoetanol (Sigma #M7154) en 950 μ l de 2X Laemmli Sample Buffer (BIORAD #1610737). Esta mezcla se calentó a 95-100 °C durante 5 min con el objetivo de desnaturalizar las proteínas. Previamente, los geles fueron preparados manualmente siguiendo la composición expuesta en la tabla 5. Se empleó tampón de



MATERIALES Y MÉTODOS

electroforesis TGS 1x compuesto por tris-glicina (BIORAD #161-0734) /dodecilsulfato sódico (SDS; Sigma #L5750) a partir de TGS 10X (BIORAD #161-0772). El SDS es un detergente aniónico que dispersa los agregados proteicos y garantiza la desnaturalización, así como la carga negativa para poder así diferenciar las proteínas exclusivamente en función de su tamaño.

A continuación, el contenido de proteína se sometió a electroforesis en geles de acrilamida preparados con las proporciones mostradas en la tabla 5. La acrilamida permite variar el tamaño del poro y, así, lograr resolver proteínas de distintos tamaños.

En el primer pocillo añadimos 5 μ l de marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standards (BIORAD #1610376) para poder identificar las diferentes bandas de proteínas. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante 120 V durante aproximadamente 1 hora.

Posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF de 0,2 μ m (Bio-Rad, 1704156) mediante el uso del equipo de transferencia (Bio-Rad, Trans-Blot Turbo™). Para evitar las uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon con a temperatura ambiente en agitación en solución salina tamponada con Tris (TBS) con 0.05% de Tween-20 (TBS-T) con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% y se incubaron durante la noche a 4 ° C en agitación con los anticuerpos primarios específicos mostrados en la tabla 6. A las 24h, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos secundarios (*tabla 6*) en BSA al 5% en TBST. Las bandas inmunorreactivas se detectaron utilizando sustrato quimioluminiscente Pierce™ ECL Plus Western Blotting Substrate (Thermo Scientific #32132) siguiendo el protocolo del fabricante y se visualizaron en una estación Amersham Imager 600 (GE Healthcare live sciences, Marlborough, MA, EE. UU.).

Tras la visualización de las bandas de GAPDH y MLKL-P, se procedió al uso del reactivo Restore™ Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific #21059) durante 20 min, lo que permite la reincubación con un nuevo anticuerpo primario, en nuestro caso con Iba1. Se realizó el bloqueo de igual manera, con la posterior incubación a 4°C toda la noche en agitación. Procediendo de manera similar el resto del proceso.

Las proteínas fueron cuantificadas mediante el programa informático ImageJ y normalizando con los valores de GAPDH.

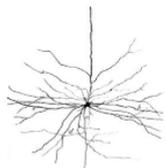


Tabla 5. Composición de los geles de electroforesis de WB. Los cálculos se corresponden a la preparación de un gel al 12% de acrilamida.

	RUNNING (12%)	STACKING (4%)
H ₂ O miliQ	3,28 ml	2,85 ml
Bis/Acrilamida	4 ml	660 µl
TRIS (Runnig/stacking)	2,5 ml	1,25 ml
SDS 10%	100 µl	50 µl
Amonium persulfate (APS)	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Tabla 6. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en Westernn-blot.

ANTÍGENO	CONCENTRACIÓN	HUÉSPED	CASA COMERCIAL	REFERENCIA
GAPDH	1:1000	Ratón	Santa Cruz	Sc365062
MLKL-P	1:1000	Conejo	Abcam	ab196436
Antimouse-Ig	1:3000	Cabra	Dako	P0447
Antirabbit-Ig	1:3000	Cerdo	Dako	P0399

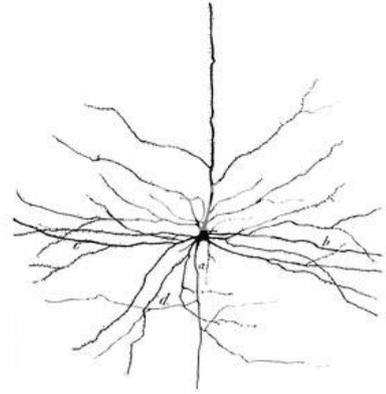
9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el programa informático SPSS for Window (IBM SPSS Modeler v 18.2; Armonk, NY, USA).

Una vez comprobado que todos los datos seguían una distribución normal, se realizó la prueba t de Student de 2 colas, para la comparación entre 2 grupos. Se distinguieron los siguientes niveles: no significativo (NS) correspondiente al valor $p > 0,05$ y significativo $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) y $p < 0,001$ (***) frente a los ratones de control.

Los resultados de los diferentes experimentos se expresaron con sus correspondientes unidades o como porcentaje (%) respecto al control. Los datos se representaron como media \pm Error Estándar de la Media (EEM) de al menos una $n \geq 3$ de experimentos independientes.

RESULTADOS



CAPÍTULO I.

LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

SI.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL CASPASA 8 KO

Los sujetos destinados a las pruebas de inmunohistología fueron genotipados para la confirmación de la delección homocigótica de Caspasa 8. El genotipado fue realizado mediante PCR convencional a partir de una muestra de tejido de la cola.

Tal y como se muestra en la figura 13, se puede observar individuos con una única banda a 900pb, lo que se traduce en que son embriones Caspasa 8 KO, siendo heterocigotos los que expresan además otra banda a 400pb.

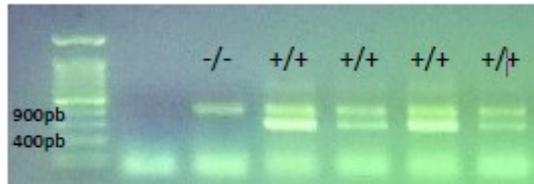


Figura 13. Ejemplo de gel de agarosa correspondiente al genotipado de parte de los embriones E13.5 empleados para el estudio de inmunofluorescencia.

Los embriones destinados a biología molecular fueron genotipados directamente por RT-PCR, confirmando la reducción significativa de la expresión del gen de Caspasa 8 en los sujetos experimentales con respecto a los controles en los distintos tiempos embrionarios estudiados. Así obtuvimos un descenso del 86,67% ($p=0,007$) a E11.5 (Figura 14A); un 98,38% ($p=0,003$) a E12.5 (Figura 14B) y un 85,89% ($p=3,63279E^{-05}$) a E13.5 (Figura14C).

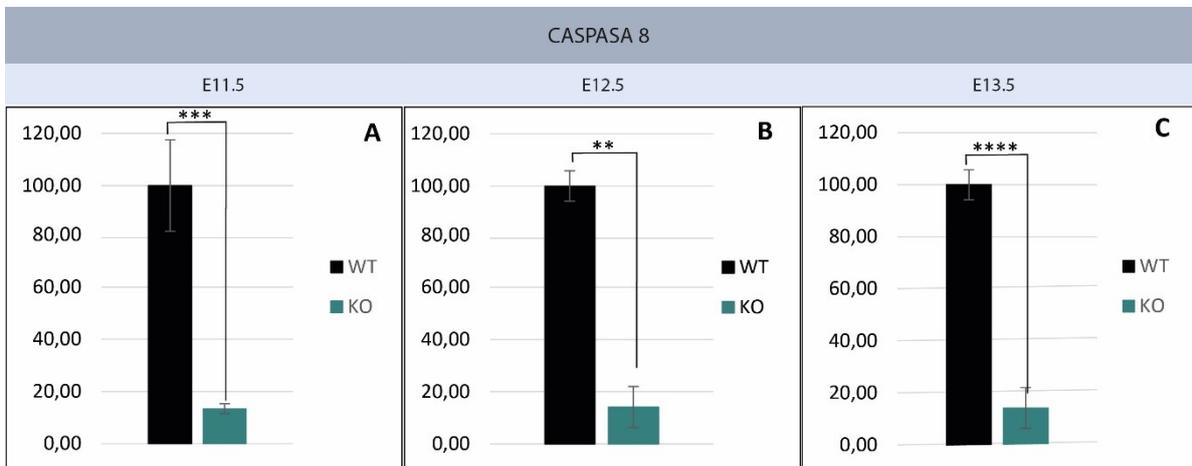


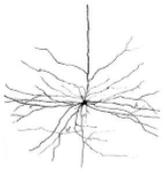
Figura 14. Comprobación del modelo experimental. La medición de los niveles de Caspasa 8 por ARNm en el cerebro mostraron disminución significativa en los ratones Caspasa 8 KO a E11.5 (A), E12.5 (B) y E13.5 (C) con respecto a los controles. N=5/6 ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control.

SI.2 LA DELECIÓN DE CASPASA 8 DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SUPONE UNA MENOR DIFERENCIACIÓN MORFOLÓGICA Y DEFICIENTE CONSERVACIÓN TISULAR

Si bien se debe confirmar por pruebas específicas, en el mismo momento de la extracción ya se puede sospechar el genotipo de los sujetos debido al aspecto físico, lo que incluye diferencias de tamaño, de color del líquido amniótico y saco vitelino, el nivel de vascularización, la diferenciación de estructuras y la observación del latido del corazón. Hallazgos que concuerdan con los resultados obtenidos por *Los et al., 1999* y *Kang et al., 2004*. Como se muestra en la figura 15, los sujetos Caspasa 8 *KO* son claramente más pequeños, con menos desarrollo cardiovascular, aunque en la mayoría de las ocasiones aparece acumulación de sangre en la zona torácica lo que concuerda con la causa de muerte mayoritaria consecuencia de esta mutación, el fallo cardíaco (*Kavanagh et al., 2015*). Así mismo, los sujetos delecionados presentan tanto la placenta como el líquido amniótico con una coloración amarillenta. Podemos observar a simple vista una menor diferenciación morfológica, presentando menor desarrollo de las extremidades y ausencia o defecto en la formación de orejas y ojos. Cabe destacar también una deficiente conservación tisular. Los tejidos de los sujetos Caspasa 8^{del/del} se presentan en un estado arenoso e inconsistente, siendo compleja su manipulación.



Figura 15. Apariencia física embriones E13.5 en el momento de la extracción. En A observamos un sujeto control en el que podemos diferenciar estructuras con mayor facilidad que en el Caspasa 8^{del/del} presentado en B. La figura C muestra de manera más clara la diferencia de tamaño entre los sujetos, controles y Caspasa 8 *KO* de izquierda a derecha. D Presentación de una misma camada a E13.5.



SI.3 LA CASPASA 8 SE EXPRESA DE MANERA UBICUA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

Tras observar las evidencias a nivel visual, quisimos en primer lugar estudiar el marcaje de Caspasa 8 en el embrión control con el fin de identificar las localizaciones anatómicas en las que podría tener una implicación esencial.

Se realizó un barrido general de la expresión de Caspasa 8 mediante estudio histológico por inmunofluorescencia. En la figura 16 observamos una imagen de inmunofluorescencia representativa de un embrión control a E13.5 marcado con Caspasa 8 (*Figura 16A*) y Hoecht como marcaje nuclear (*Figura 16B*). Como podemos observar la expresión de Caspasa 8 es ubicua y abundante en el embrión control.

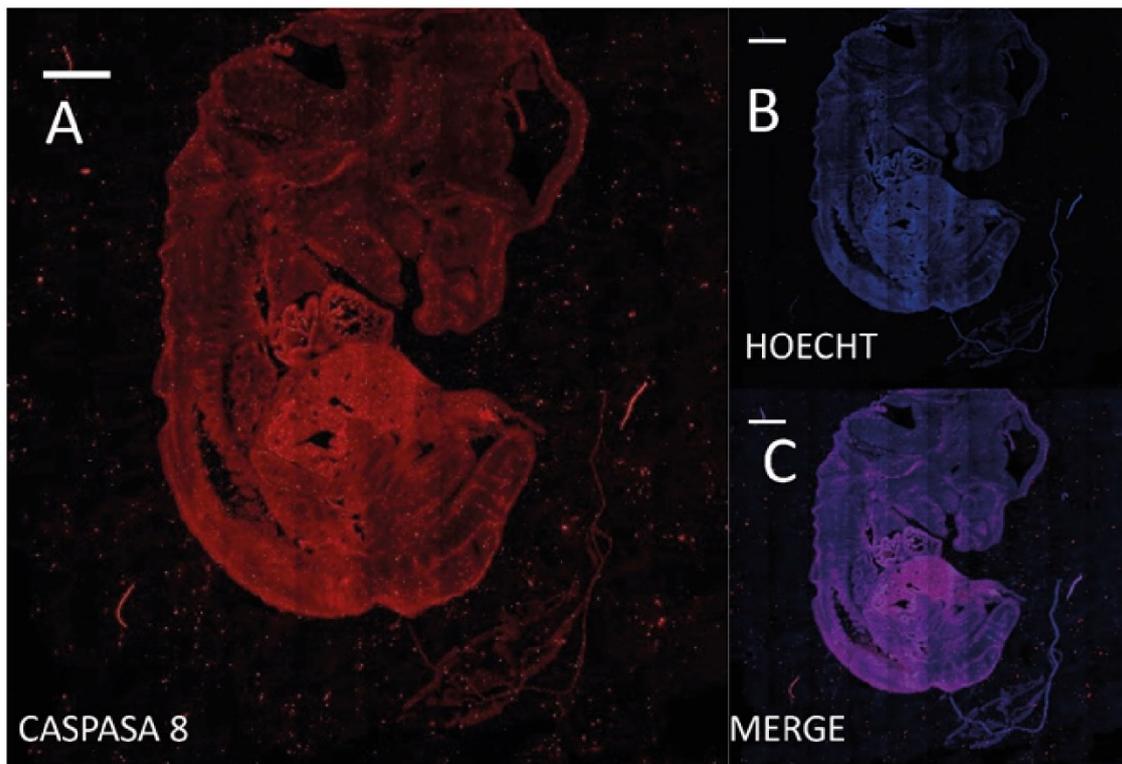


Figura 16. La Caspasa 8 presenta un marcaje ubicuo y abundante en los sujetos control. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital de un embrión control E13.5. De izquierda a derecha podemos observar Caspasa 8 (en rojo), marcaje nuclear HOECHST (en azul), y finalmente, la superposición de las anteriores. Barra de calibración 800 μ m.

SI.4 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DELECIÓN DE CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA MICROGLÍA

SI.4.1 LA DELECIÓN DE CASPASA 8 SUPONE UNA REDUCCIÓN DE DIVERSOS MARCADORES DE MICROGLÍA HOMEOSTÁTICA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

Como se mencionó en la introducción, las Caspasas son una de las vías de modulación de microglía por lo que procedimos a estudiar qué supondría la delección de Caspasa 8 en esta población celular durante la embriogénesis. Obtuvimos sujetos a distintos estadios embrionarios y realizamos pruebas de inmunohistología así como RT-PCR para el estudio de distintos marcadores de microglía, centrándonos en este punto, solo en la zona del cerebro.

El uso marcador microglial Iba1 mediante inmunofluorescencia reveló un descenso cualitativo de los niveles de marcaje microglía en ausencia de Caspasa 8 (Figura 17A) a E13.5. La posterior cuantificación de las células Iba1⁺ de las imágenes obtenidas en confocal confirmó el descenso significativo de microglía en ausencia de Caspasa 8 (Figura 17B). Sin embargo, el estudio a E11.5 no reveló ningún cambio significativo en el contaje de Iba1 en ausencia de Caspasa 8 (Figura 18).

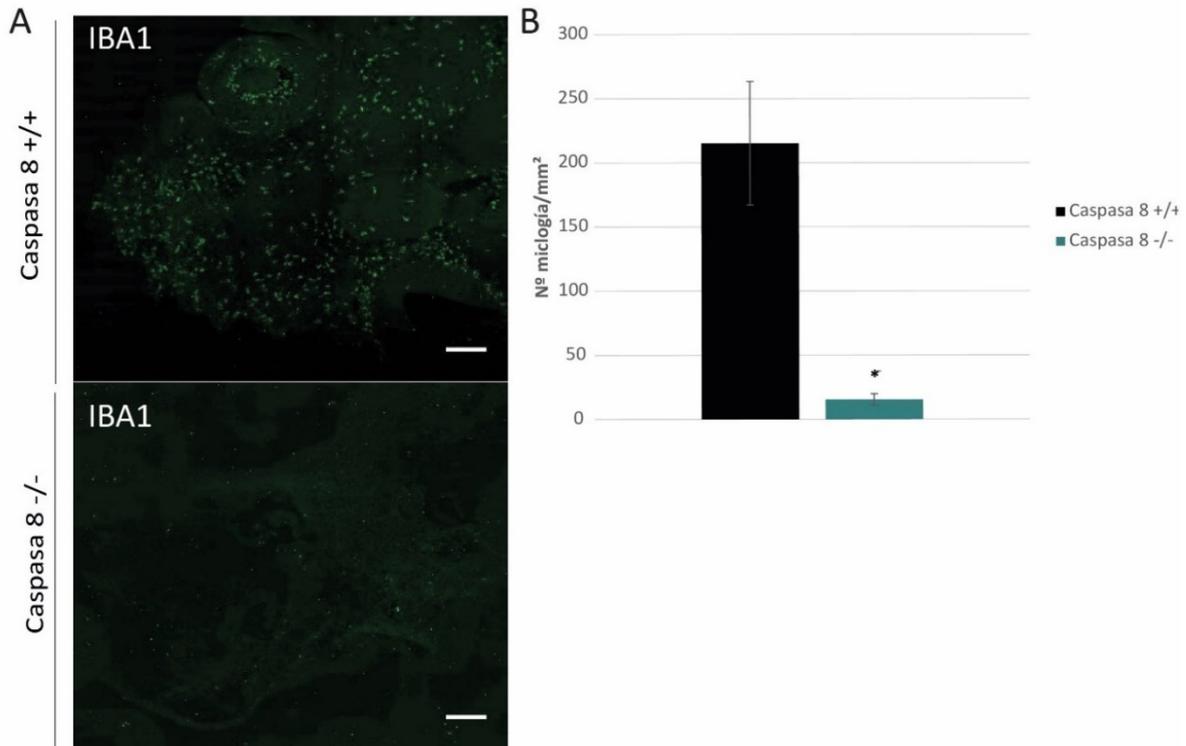


Figura 17. Disminución cualitativa y cuantitativa del marcaje Iba1 en ausencia de Caspasa 8. (A) Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital de un embrión control (arriba) y Caspasa 8 KO (abajo). Marcaje Iba 1 (verde). Barra de calibración 200 μm. (B) Gráfico de barras de cuantificación de Iba 1⁺ en inmunofluorescencia de E13.5 expresada en nº de microglía/mm². * Hace referencia a las diferencias significativas entre los dos grupos p<0,05. La significación se calculó mediante la prueba t- student de estadística, n igual a 3 por grupo.

RESULTADOS

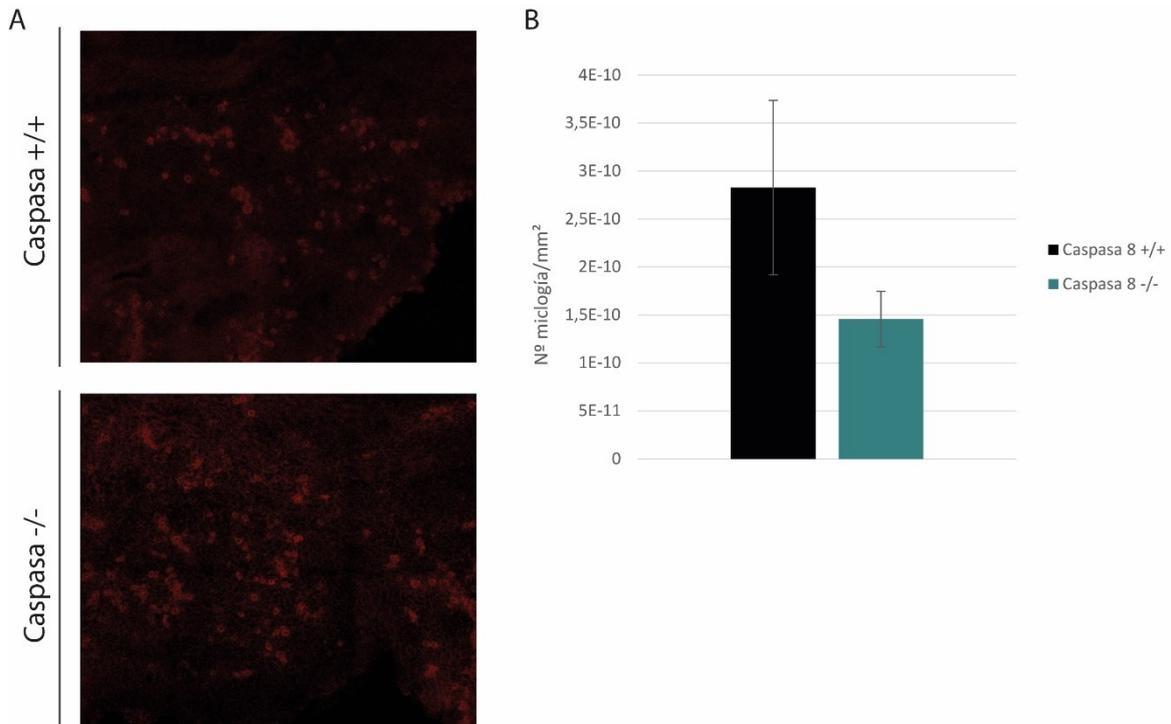


Figura 18. Cuantificación marcaje Iba1 en inmunofluorescencia. (A) Imágenes ROI representativas de inmunofluorescencia de corte sagital de un embrión control (arriba) y Caspasa 8 KO (abajo). Marcaje Iba 1 (rojo). (B) Gráfico de barras de cuantificación de Iba 1⁺ en inmunofluorescencia de E11.5 expresada en nº de microglía/mm².

Este hallazgo en el estudio de la microglía quiso ser confirmado mediante el estudio de los niveles de ARNm de distintos marcadores específicos de microglía.

A E11.5 no se observaron cambios en la expresión de los marcadores específicos de microglía CX3R1 (Figura 19A), Tmem119 (Figura 19D), ni en CD11b (Figura 19F) en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles. Sin embargo, a E12.5 si pudimos observar un descenso significativo ($P=0,048$) de un 81,13% del marcador de microglía CX3R1 en los sujetos delecionados con respecto a los controles (Figura 19B) así como de CD11b (Figura 19G; $P=0,018$; 58,79%).

Los niveles de expresión del marcador Tmem119 a E13.5 experimentaron una reducción significativa ($P=0,012$) de un 42,45% en ausencia de Caspasa 8 (Figura 19E). También se obtuvo una reducción significativa ($P=0,03$) de un 48,9% del marcador de microglía CX3R1 en los sujetos delecionados con respecto a los controles (Figura 19C).

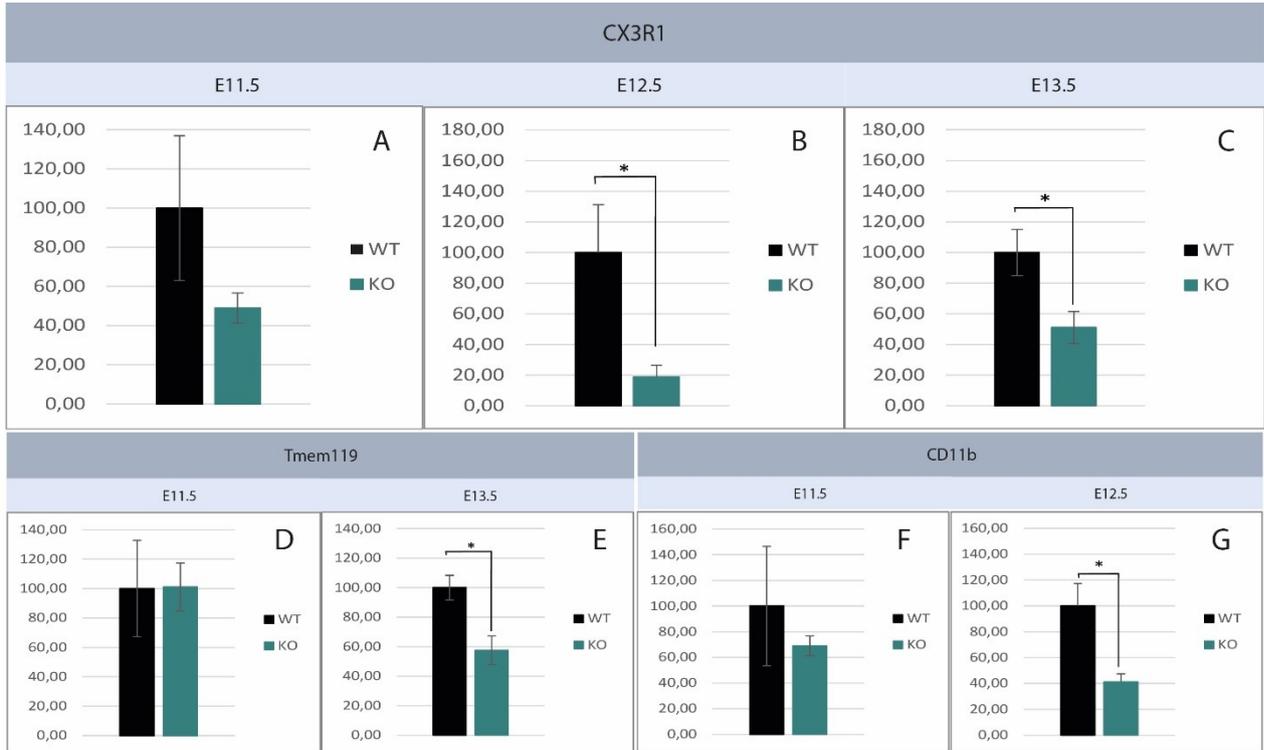
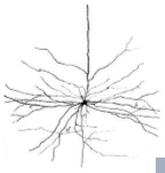


Figura 19. Niveles de expresión de marcadores homeostáticos de microglía. A, B y C. Expresión del marcador CX3R1 a E11.5, E12.5 y E13.5 respectivamente. D y E. Expresión del marcador Tmem119 a E11.5 y E13.5 respectivamente. F y G. Expresión del marcador Cd11b a E11.5 y E12.5 respectivamente. La medición de los niveles de CX3R1 mostraron disminución significativa en los ratones Caspasa 8 *del/del* a E12.5 y E13.5 con respecto a los controles. Tmem119 experimentó reducción significativa a E13.5 en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles. CD11b experimentó reducción significativa a E12.5 en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles. No se encontraron diferencias a E11.5. N=5/6 ratones/grupo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante t de student.

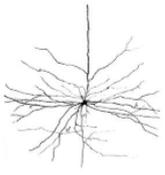
SI.4.2 LA REDUCCIÓN DE MICROGLÍA HOMEOSTÁTICA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS EN AUSENCIA DE CASPASA 8 VA ASOCIADO A UN DESCENSO DE MARCADORES DE ACTIVACIÓN MICROGLIAL

Dado el descenso de niveles de marcadores homeostáticos de microglía quisimos estudiar si había un mayor estado de activación de la microglía.

A E11.5 no se observaron cambios en la expresión del marcador de microglía asociada a neurodegeneración, Clec7a (Figura 20A), en ausencia de Caspasa 8. Tampoco se observa un cambio cualitativo en el marcaje de Clec7a en la inmunofluorescencia mostrada en la figura 21. Sin embargo, a E13.5 experimentó una reducción significativa ($P=0,001$) de un 75,61% en los sujetos delecionados con respecto a los controles (Figura 20B). El análisis cualitativo de Clec7a en la inmunofluorescencia mostrada en la figura 20 a E13.5 no muestra un cambio tan evidente, aunque sí una aparente reducción cualitativa.

Aunque Gal3 se identificó por primera vez en macrófagos periféricos (Sundblad et al., 2011), se viene utilizando cada vez más como un marcador de activación microglial (Lalancette-

RESULTADOS



Hébert et al., 2012). A E11.5 obtuvimos un aumento significativo ($P=0,024$) de un 401,5% del marcador Gal3 en los sujetos delecionados con respecto a los controles (*Figura 20C*). Por el contrario, a E13.5 se observó un descenso significativo ($P= 0,013$) de un 67,6% en los sujetos en ausencia de Caspasa 8 (*Figura 20D*).

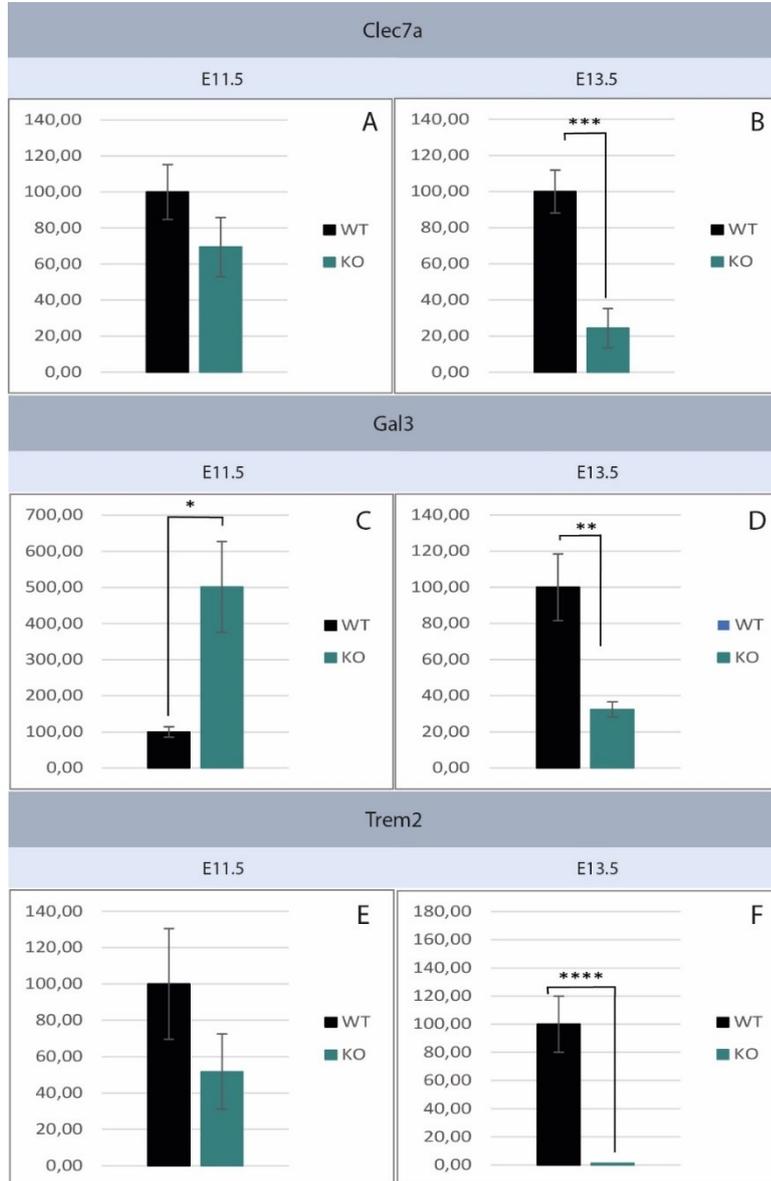
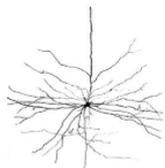


Figura 20. Niveles de expresión de marcadores de microglía reactiva y DAM. A y B. Expresión del marcador *Clec7a* a E11.5 y E13.5 respectivamente. C y D. Expresión del marcador *Gal3* a E11.5 y E13.5 respectivamente. E y F. Expresión del marcador *TREM2* a E11.5 y E13.5 respectivamente. La medición de los niveles de *Clec7a*, *Gal3* y *Trem2* mostraron disminución significativa en los ratones *Caspasa 8^{del/del}* a E13.5 con respecto a los controles. No se encontraron diferencias a E11.5 para *Clec7a* y *Trem2*, pero sí para *Gal3* experimentando un aumento significativo en ausencia de *Caspasa 8*. $N=5/6$ ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante *t* de student.

Con respecto al marcaje de Gal3, en las inmunofluorescencias mostradas a continuación, podemos observar que existe la misma tendencia cualitativa que en los datos de RT-PCR. A E11.5



RESULTADOS

observamos un marcaje cualitativamente mayor de Gal3 en ausencia de Caspasa 8 (*Figura 23*). Mientras que a E13.5 se muestra un marcaje cualitativamente superior en los sujetos controles (*Figura 24*). Tal y como vemos en la inmunofluorescencia de la figura 25 a cuerpo completo de embrión a E13.5, el marcaje de Gal3 en presencia de Caspasa 8 es amplio y ubicuo.

La mencionada en la introducción microglía DAM, es activada por la señalización de TREM2 (*Wang et al., 2015; Lee et al., 2018*). A E11.5 no se observaron cambios en la expresión del marcador TREM2 (*Figura 20E*), en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles. Sin embargo, obtuvimos un descenso significativo a E13.5 ($P= 0,009$) de un 440,3% del marcador TREM2 en los sujetos delecionados con respecto a los controles (*Figura 20F*).

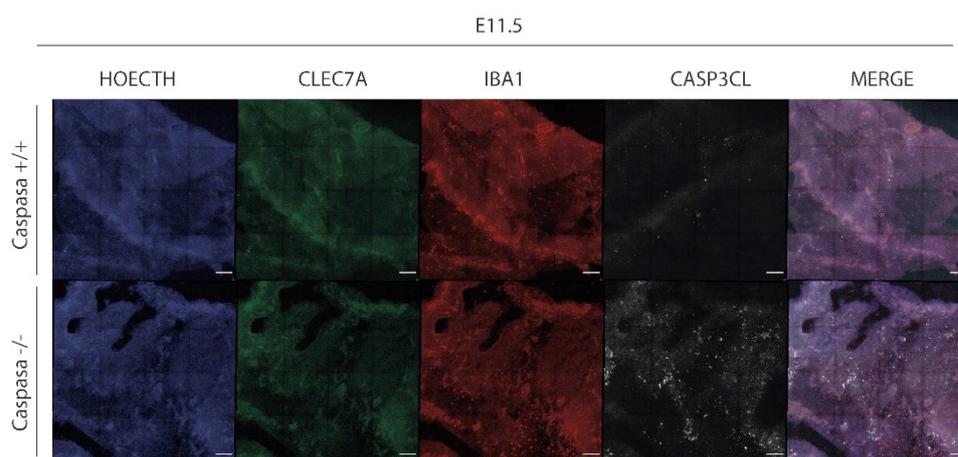


Figura 21. Inmunofluorescencia embrión a E11.5. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital embriones a E11.5. De izquierda a derecha: marcaje nuclear (azul), *Clec7a* (verde), *Iba1* (rojo), Caspasa 3 activa (gris) y la superposición de todos los canales. Línea superior sujeto control inferior Caspasa 8 KO. Barra de calibración 100 μm .

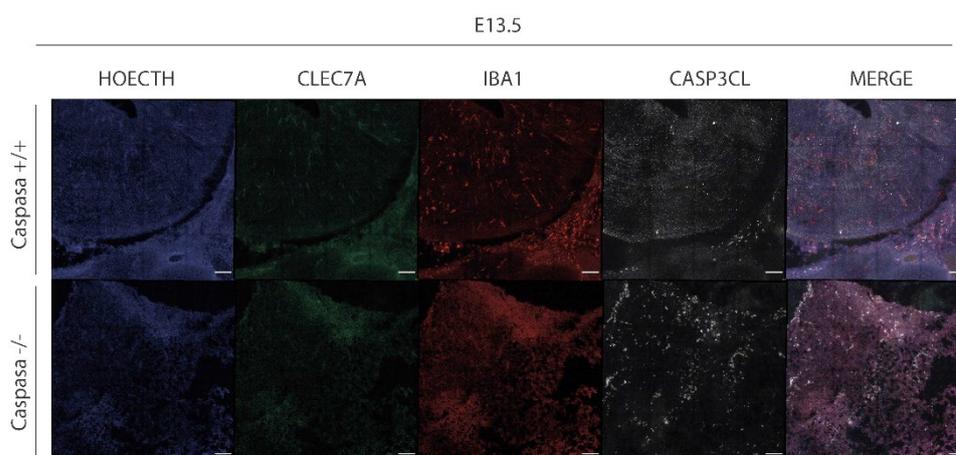
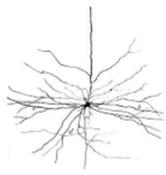


Figura 22. Inmunofluorescencia embrión a E13.5. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital embriones E13.5. De izquierda a derecha: marcaje nuclear (azul), *Clec7a* (verde), *Iba1* (rojo), Caspasa 3 activa (gris) y la superposición de todos los canales. Línea superior control, inferior Caspasa 8 KO. Barra de calibración 100 μm .



RESULTADOS

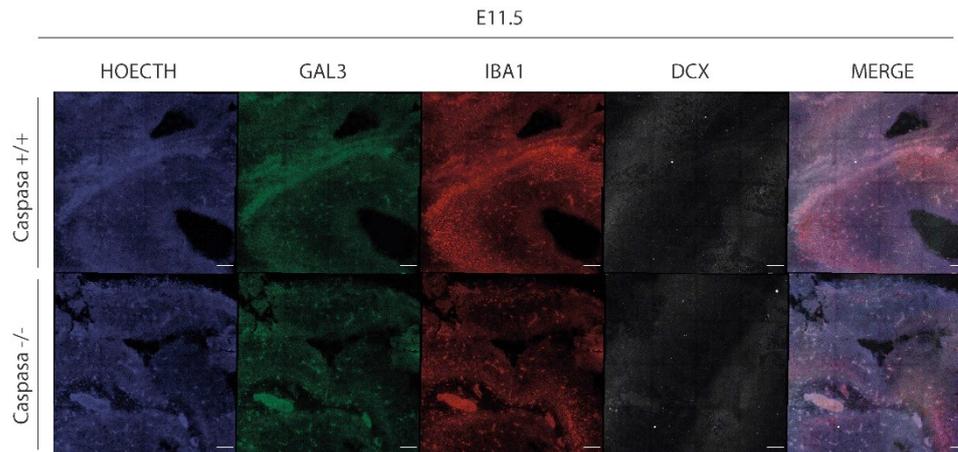


Figura 23. Inmunofluorescencia embrión a E11.5. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital de embriones a E11.5. De izquierda a derecha: marcaje nuclear (azul), Gal3 (verde), Iba1 (rojo), DCX (gris) y la superposición de todos los canales. Línea superior sujeto control, inferior Caspasa 8 KO. Barra de calibración 100 μ m.

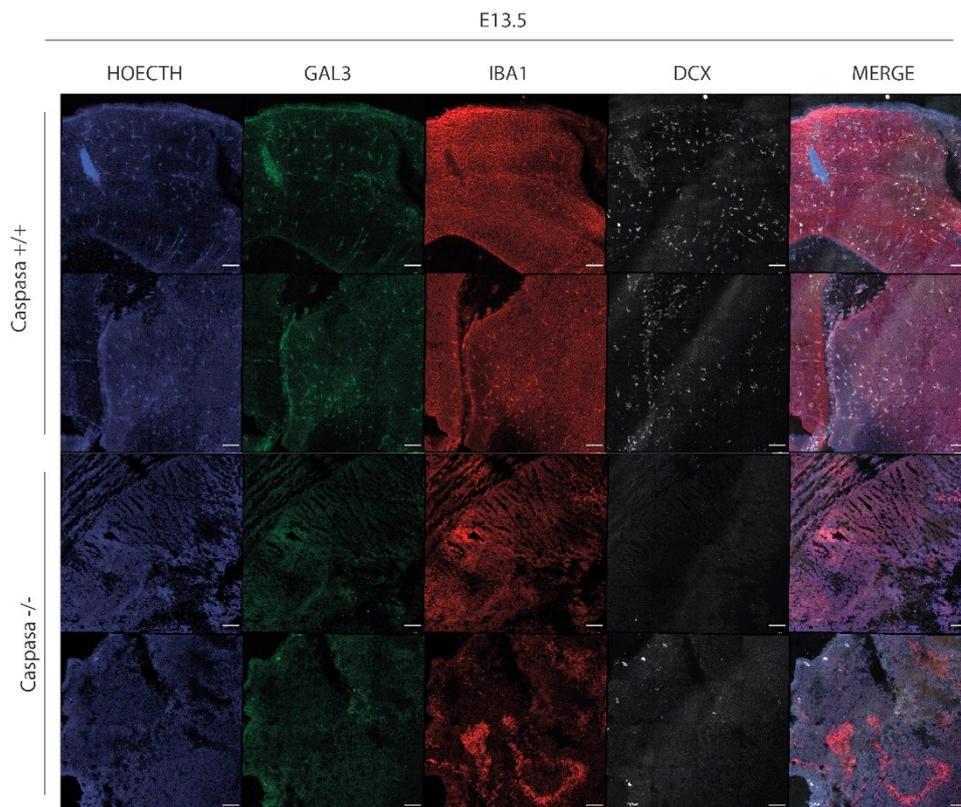


Figura 24. Inmunofluorescencia embrión a E13.5. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital de embriones E13.5. De izquierda a derecha: marcaje nuclear (azul), Gal3 (verde), Iba1 (rojo), DCX (gris) y la superposición de todos los canales. Línea superior sujetos controles, inferior Caspasa 8 KO. Barra de calibración 100 μ m.

E13.5

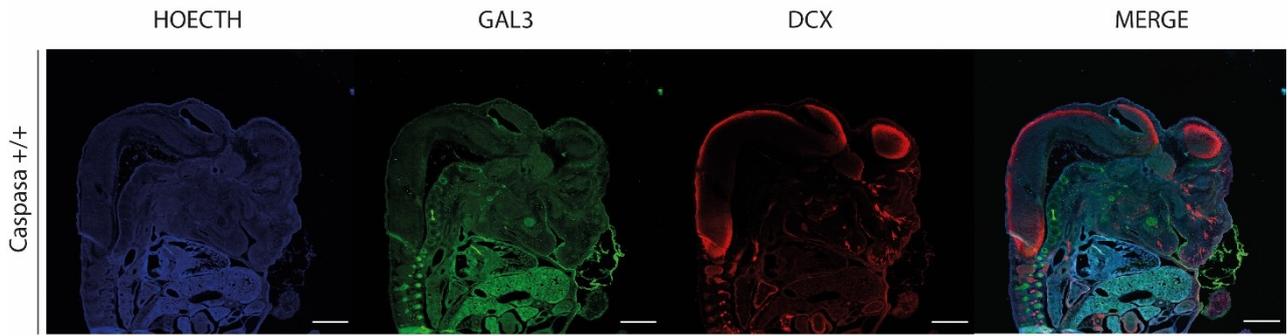


Figura 25. Inmunofluorescencia embrión completo a E13.5. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital de un embrión control E13.5. De izquierda a derecha: marcaje nuclear (azul), Gal3 (verde), DCX (rojo) y la superposición de todos los canales. Barra de calibración 200 μ m.

SI.5 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DELECIÓN DE CASPASA 8 EN LA PROLIFERACIÓN

Quisimos valorar los niveles de marcadores proliferativos como Ki67 y CSF1R. A E11.5 no se observaron cambios en la expresión del marcador CSF1R (Figura 26A) ni Ki67 (Figura 26C) en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles. Sin embargo, ambos marcadores experimentaron una reducción significativa a E13.5. Obtuvimos una reducción significativa ($P=0,0001$) de un 63,63% del marcador CSF1R (Figura 26B), así como de Ki67 en ausencia de Caspasa 8 (Figura 26D A E13.5; $P=0,0006$; 98,76%) en los sujetos delecionados con respecto a los controles.

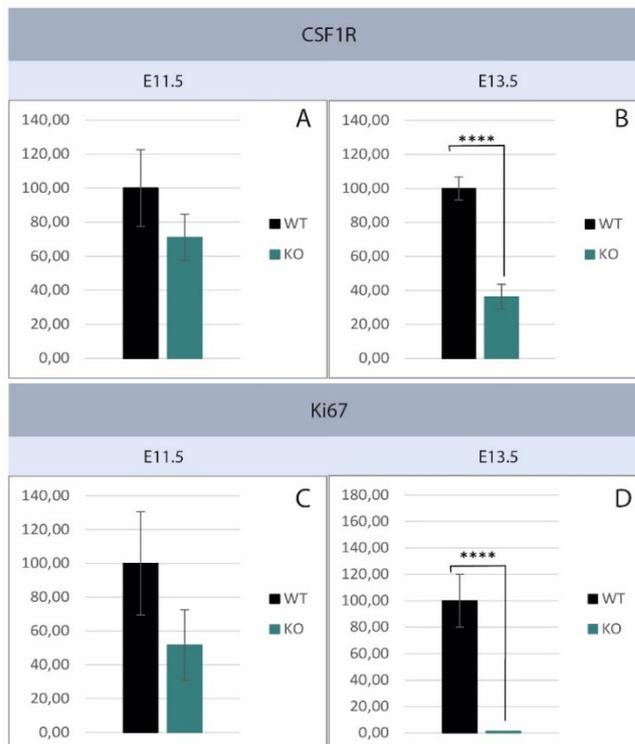
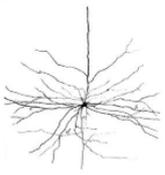


Figura 26. Niveles de expresión de marcadores de proliferación. A y B. Expresión del marcador CSF1R a E11.5 y E13.5 respectivamente. C y D. Expresión del marcador Ki67 a E11.5 y E13.5 respectivamente. La medición de los niveles de CSF1R y Ki67 mostraron disminución significativa en los ratones Caspasa 8 *del/del* a E13,5 con respecto a los controles. No se encontraron diferencias a E11.5. $N=5/6$ ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante *t* de student.



SI.6 LA AUSENCIA DE CASPASA 8 DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS REDUCE LA ACTIVIDAD FAGOCÍTICA MICROGLIAL

El estudio de los niveles de ARNm de marcador de fagocitosis Mertk reveló un descenso significativo a E11.5 ($P= 0,008$) de un 60,77% en los sujetos delecionados con respecto a los controles (*Figura 27A*). Dicho descenso fue de un 92,25% a E13.5 en ausencia de Caspasa 8 (*Figura 27B*; $P=3,8403E-06$).

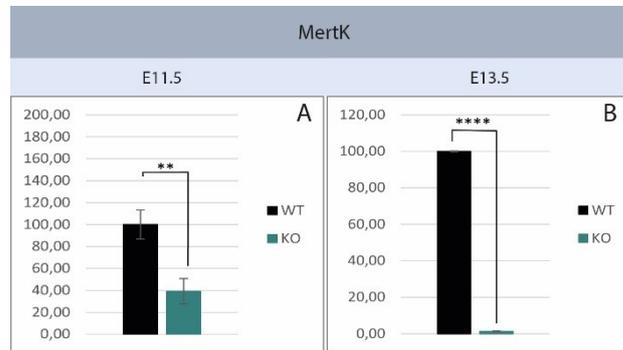


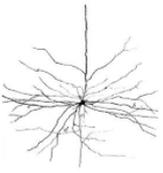
Figura 27. Niveles de expresión de marcador fagocítico microglial. A y B. Expresión del marcador MertK a E11.5 y E13.5 respectivamente. La medición de los niveles de ARNm de MertK mostraron disminución significativa en los ratones Caspasa 8 *del/del* a E11.5 y E13,5 con respecto a los controles. $N=5/6$ ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante *t* de student.

SI.7 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DELECIÓN DE CASPASA 8 EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES TEMPORALES DE NEUROGÉNESIS

En ausencia de Caspasa 8 se obtuvieron niveles significativamente inferiores de DCX y Nestina a los controles tanto a E11.5 como a E13.5. A E11.5 la reducción de DCX, marcador de neurona inmadura, fue de un 67,17%, en los sujetos delecionados con respecto a los controles (*Figura 28C*; $P=0,035$). Un descenso que fue más acusado en el caso de los sujetos KO a E13.5, de un 99,57% (*Figura 28D*; $P= 0,001$).

Los datos obtenidos del estudio de DCX mediante RT-PCR confirmaron la valoración cualitativa de la inmunofluorescencia a E13.5 (*Figura 24*), donde también observamos una reducción en ausencia de Caspasa 8. Sin embargo, la reducción en los sujetos delecionados a E11.5 mostrados por RT-PCR no concuerdan con los cambios cualitativos observados a E11.5 (*Figura 23*), donde vemos un marcaje similar en ambos grupos estudiados.

En el caso del precursor de neuronas, Nestina, observamos una reducción del 68,64% en los sujetos carentes de Caspasa 8 de E11.5 en comparación con los controles (*Figura 28E*; $P= 0,027$). A E13.5 la reducción fue de un 91,31% en los sujetos delecionados con respecto a los controles (*Figura 28F*; $P= 0,05$). Sin embargo, no se obtuvieron cambios significativos de los



RESULTADOS

niveles del marcador astrogliar GFAP ni a E11.5 (Figura 28A) ni a E13.5 (Figura 28B) en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles.

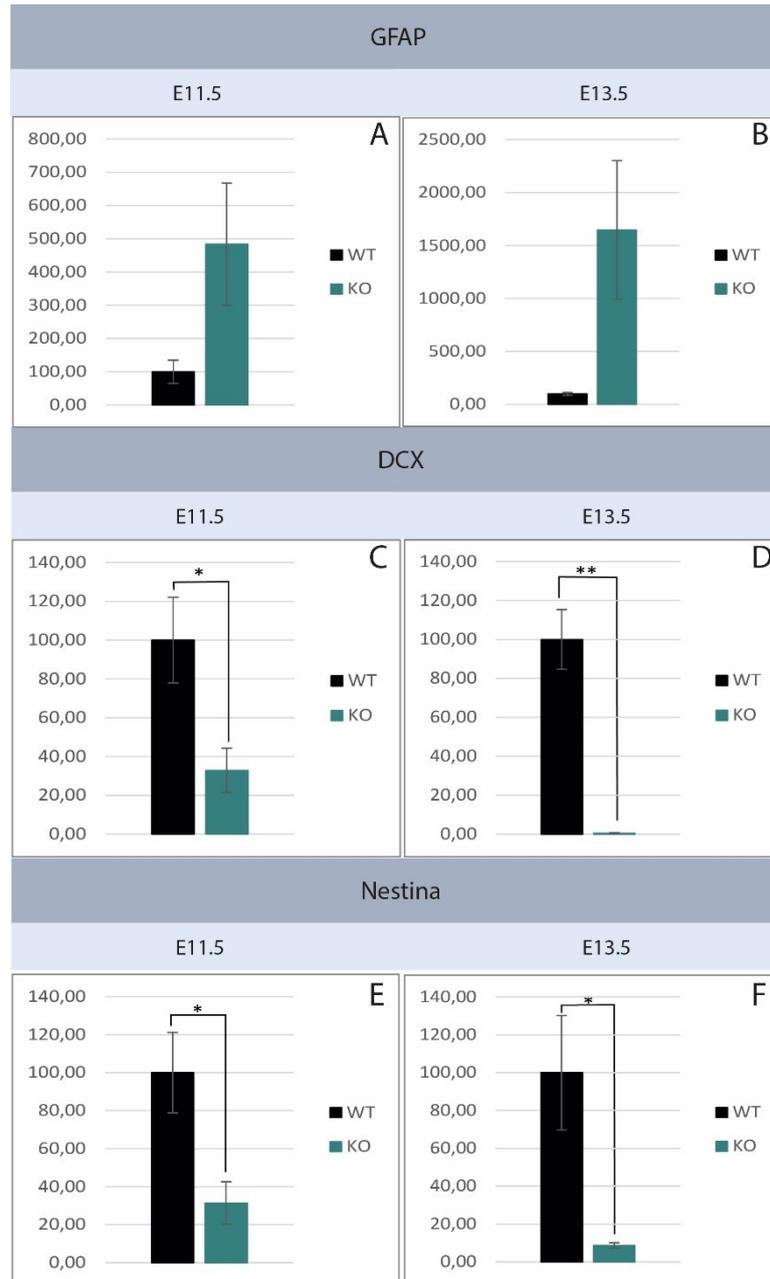
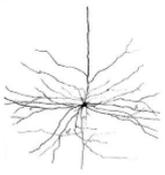


Figura 28. Niveles de expresión de marcadores celulares. A y B. Expresión del marcador DCX a E11.5 y E13.5 respectivamente. C y D. Expresión del marcador Nestina a E11.5 y E13.5 respectivamente. E y F. Expresión del marcador GFAP a E11.5 y E13.5 respectivamente. La medición de los niveles de ARNm de DCX y Nestina mostraron disminución significativa en los ratones Caspasa 8 *del/del* a E11.5 y E13.5 con respecto a los controles. N=5/6 ratones/grupo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante t de student.

SI.8 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DELECIÓN DE CASPASA 8 EN LA INFLAMACIÓN

Dado el papel de la microglía en la inflamación, a continuación, se llevó a cabo el estudio de diversos marcadores inflamatorios mediante RT-PCR. A E11.5 obtuvimos una reducción

RESULTADOS



significativa de un 46,75% del marcador iNOS en los sujetos delecionados en comparación con los controles (*Figura 29A*; $P=0,029$), lo que contrasta con el aumento presentado a E13.5 de un 1194,87% en ausencia de Caspasa 8 (*Figura 29B*; $P= 0,003$). A este tiempo observamos también un aumento del marcador de IL1 β en los sujetos delecionados de un 454,86% con respecto a los sujetos con Caspasa 8 (*Figura 29D*; $P= 0,003$), no obteniendo cambios a E11.5 (*Figura 29C*). Con respecto al marcador TNF α observamos una disminución significativa de un 79,23% de los sujetos delecionados con respecto a los controles (*Figura 29F*; $P= 0,006$), sin encontrar de nuevo diferencias entre los grupos estudiados a E11.5 (*Figura 29E*).

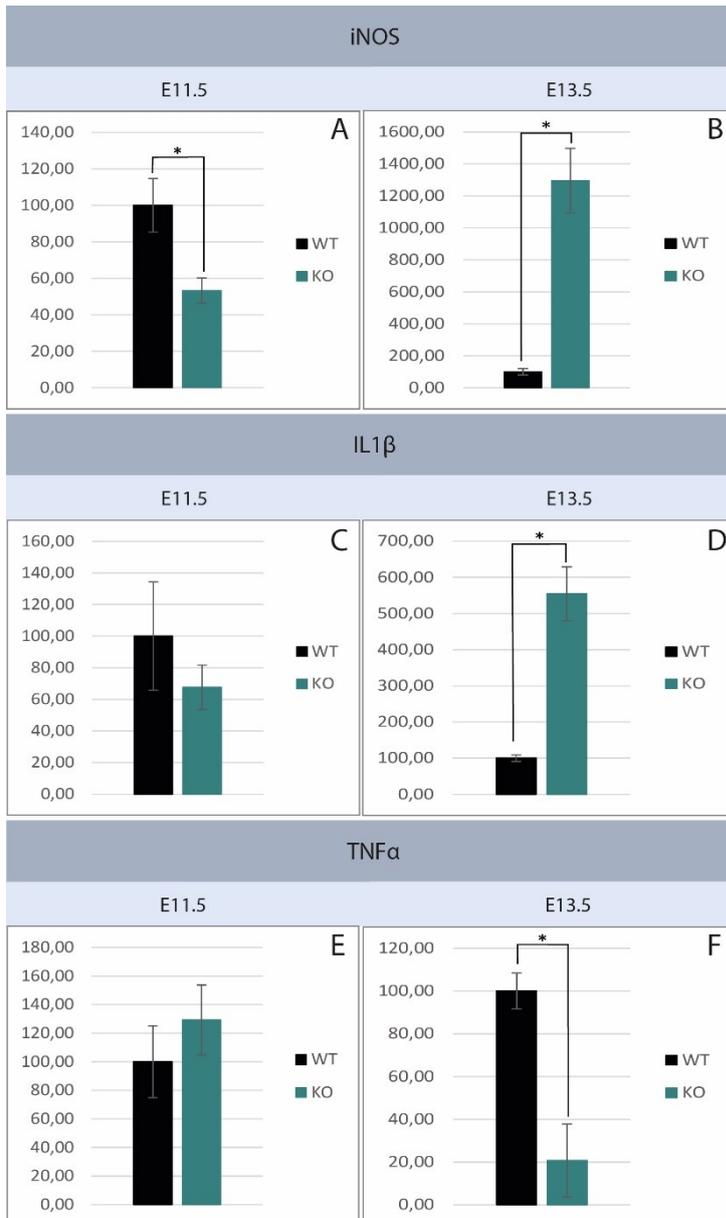


Figura 29. Niveles de expresión de marcadores inflamatorios. A y B. Expresión del marcador iNOS a E11.5 y E13.5 respectivamente. C y D. Expresión del marcador IL1 β a E11.5 y E13.5 respectivamente. F y G. Expresión del marcador TNF α a E11.5 y E13.5 respectivamente. La medición de los niveles de ARNm de iNOS e IL1 β mostraron aumento significativo en los ratones Caspasa 8 *del/del* a E13.5 con respecto a los controles. TNF α se vio reducido significativamente a E13.5. A E11.5 solo hubo diferencias significativas en los niveles de iNOS, aumentados con respecto a los controles. $N=5/6$ ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante *t* de student.

SI.9 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA DELECIÓN DE CASPASA 8 EN LA NECROPTOSIS

Debido a que la muerte en ausencia de Caspasa 8 se ha descrito que sucede por un aumento de la vía necroptótica, quisimos estudiar el estado de dicha vía en los cerebros de nuestros sujetos.

El estudio de las quinasas implicadas en la muerte necroptótica RIPK1 y RIPK3 fue llevado a cabo mediante RT-PCR. Los datos obtenidos para RIPK1 en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles no reveló ningún tipo de cambio a E11.5 (Figura 30A), no siendo así para E13.5, donde observamos una reducción significativa de un 87,89% (Figura 30B; $P=0,0001$).

Con respecto a RIPK3 observamos una reducción significativa en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles en ambos tiempos estudiados. A E11.5 la reducción fue de un 40,95% (Figura 30C; $P=0,013$), a E13.5 se redujo un 91,59% (Figura 30D; $P= 3,95042E-06$).

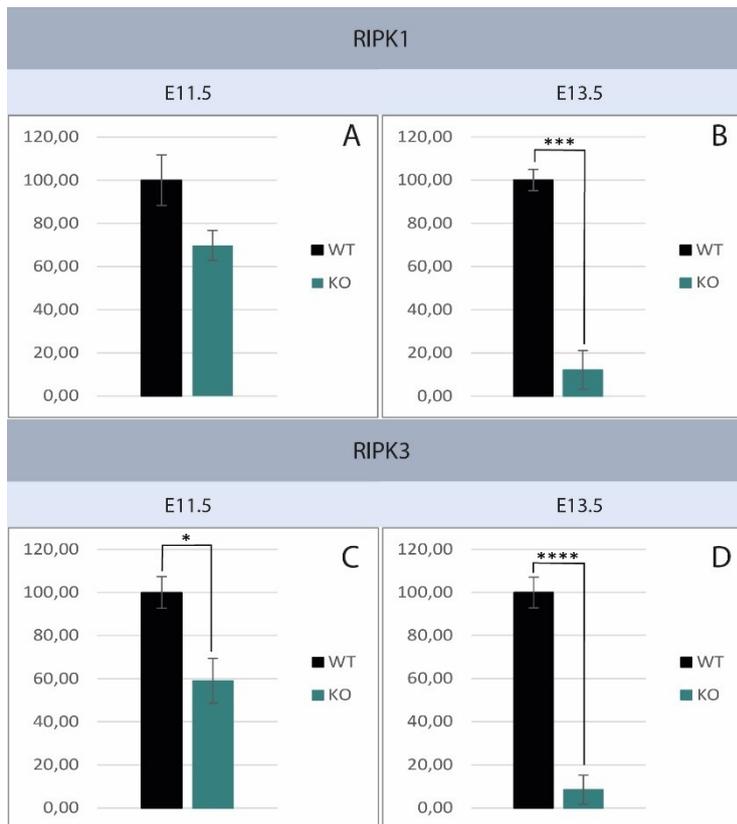
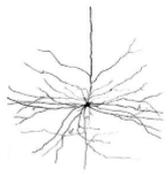


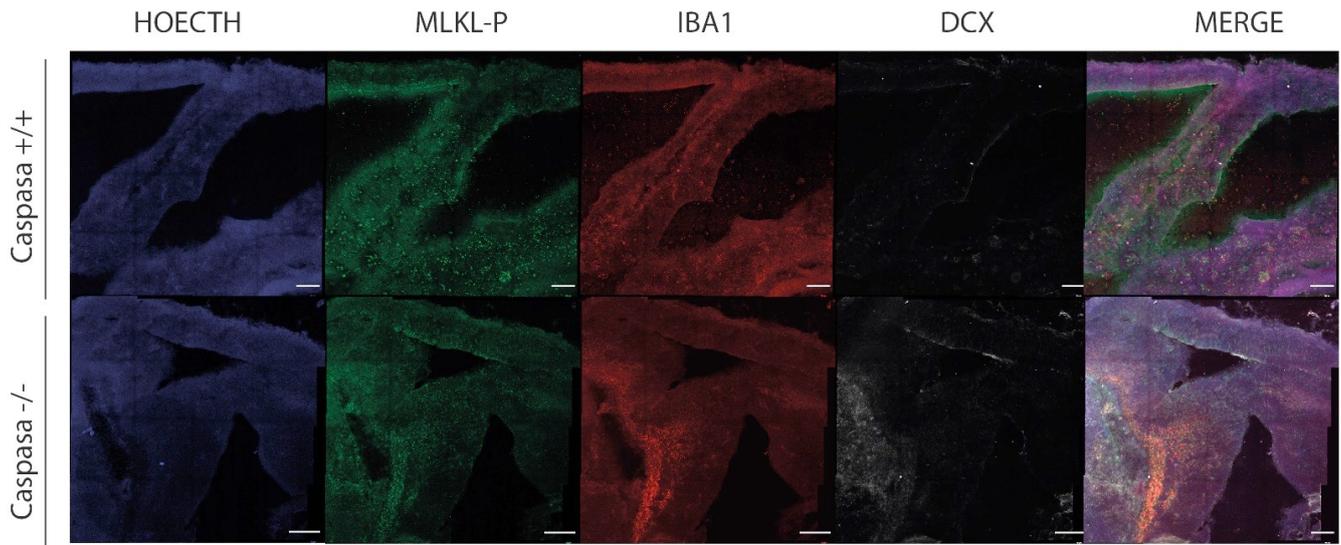
Figura 30. Niveles de expresión de marcadores de necroptosis RIPK1 y RIPK3. A y B. Expresión del marcador RIPK1 a E11.5 y E13.5 respectivamente. C y D. Expresión del marcador RIPK3 a E11.5 y E13.5 respectivamente. La medición de los niveles de ARNm de RIPK3 mostraron un descenso significativo en los ratones Caspasa 8 *del/del* con respecto a los controles en los dos tiempos estudiados. Con RIPK1 solo hubo diferencias a E13.5, experimentando un descenso significativo en ausencia de Caspasa 8, sin embargo, a E11.5 no se observaron cambios en los niveles de ARNm. N=5/6 ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control. Calculado mediante t de student.

Posteriormente, se realizó un WB a E11.5 del sustrato activo de RIPK3, MLKL-P (Figura 31). Los datos no mostraron cambios significativos en la cuantificación de dicha proteína específica de la necroptosis.



RESULTADOS

E11.5



E13.5

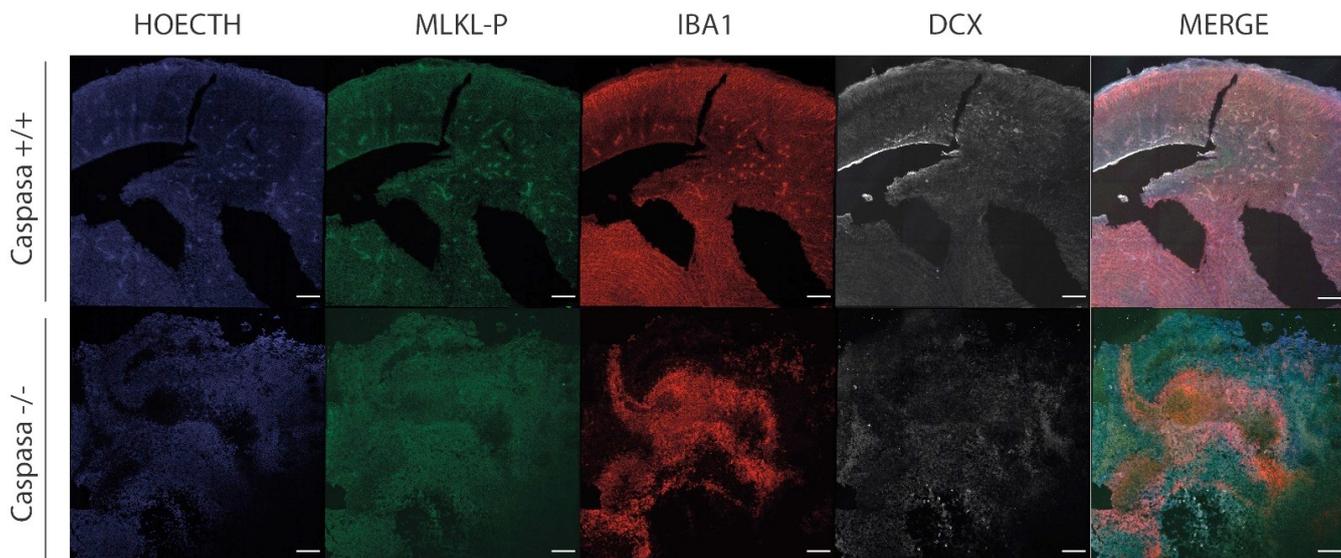
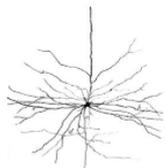


Figura 31. Inmunofluorescencia embriones a E11.5 y E13.5. Imágenes de inmunofluorescencia de corte sagital de embriones a E11.5 (superior) y E 13.5 (inferior). De izquierda a derecha: marcaje nuclear (azul), MLKL-P (verde), Iba1 (rojo), DCX (gris) y la superposición de todos los canales. Línea superior sujeto control, inferior Caspasa 8 KO. Barra de calibración 100 μ m.



CAPÍTULO II.

LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 3 EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA

SII.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL CASPASA3^{f/f}CX3CR1

Para el estudio del papel de la Caspasa 3 en la microglía, se generó un ratón condicional con deleción de Caspasa 3 en estas células en ratones adultos (*véase la sección Material y métodos y la Figura 32A*). Este modelo presenta la ventaja de que la inducción de la deleción de Caspasa 3 en la microglía depende de la administración de tamoxifeno. Ello permite la generación de un ratón condicional en un momento determinado, desarrollándose normalmente hasta el momento de la deleción.

En primer lugar, nos preguntamos si nuestros ratones experimentales presentaban expresión de Caspasa 3 en la microglía. Para ello, realizamos ensayos de inmunofluorescencia para detectar la expresión de Caspasa 3 en las células Iba1⁺, correspondientes a la microglía, en los ratones condicionales. La intensidad del marcaje de Caspasa 3 observada mostró una reducción significativa de un 57% ($p < 0,05$) en la intensidad media de Caspasa 3 en las células Iba1⁺ en el hipocampo de los ratones experimentales en comparación con los ratones de control (*Figura 32B y C*). Este resultado confirma que el sistema lox-cre para generar la deleción condicional de Caspasa 3 en la microglía funciona en nuestro modelo.

RESULTADOS

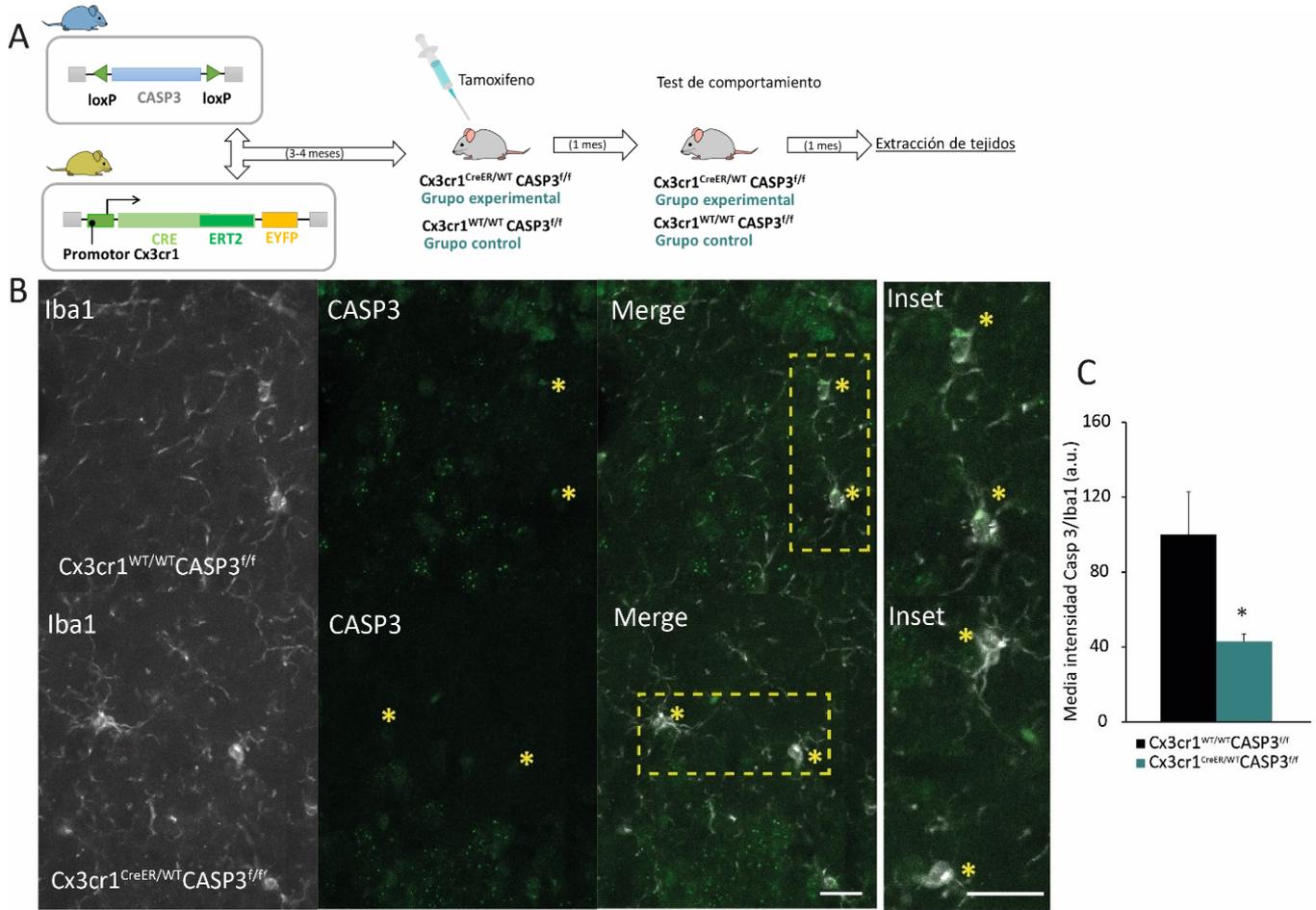


Figura 32. Generación de ratones Caspasa3^{f/f}Cx3cr1 condicionales y pruebas del modelo experimental. (A) Los ratones C57BL/6 con el alelo CASPASA 3 floxeado en el exón 2 fueron cruzados con ratones C57BL/6 que contenían una recombinasa CRE bajo el control del promotor de Cx3cr1 para obtener los ratones experimentales *Cx3cr1^{CreER/WT}-CASP3^{f/f}* y el control *Cx3cr1^{WT/WT}-CASP3^{f/f}*. Después de 3-4 meses inducimos la delección de la Caspasa 3 mediante la inyección de tamoxifeno. Un mes después, realizamos la prueba de comportamiento y, finalmente, procedimos a la extracción de tejido un mes más tarde. (B) Ensayos de inmunofluorescencia para detectar la expresión de Caspasa 3 en las células Iba1⁺, correspondientes a la microglía, en los ratones condicionales. Barra de escala = 20 μm. (C) La medición de la intensidad media del etiquetado de Caspasa 3 en las células Iba1⁺ en el hipocampo de los ratones experimentales ($42,99 \pm 3,8$; $p=0,045$) en comparación con el grupo de control ($100,00 \pm 27,87$; $p=0,045$) mostró una disminución significativa de un 57%. Los datos se expresan como media \pm SEM de $n=4$, 4 ratones/grupo. * Hace referencia a las diferencias significativas entre los dos grupos $p < 0,05$. La significación se calculó mediante la prueba t-student.

SII.2 LA DELECCIÓN DE CASPASA 3 EN LA MICROGLÍA ALTERA EL NÚMERO Y LA MORFOLOGÍA DE LA MICROGLÍA

Una vez confirmada la delección de Caspasa 3 en la microglía tras la administración de tamoxifeno, el siguiente paso fue estudiar el efecto que esta delección tenía sobre la población microglial.

La primera aproximación experimental consistió en cuantificar el número de microglía en secciones cerebrales utilizando la inmunotinción con Iba1⁺ para detectar microglía, específicamente en la corteza y el hipocampo, distinguiendo entre las regiones CA1 y GD, (Figura

33A). Se observó una reducción significativa del número de células microgliales en los animales condicionales en las dos regiones del hipocampo estudiadas (CA1: 16% ($p < 0,01$) y GD: 26% ($p < 0,001$), *Figura 33C* y *Figura 33D* respectivamente) en comparación con los compañeros de camada Cre negativos. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el número de microglías en la corteza (*Figura 33B*; $P = 0,31$).

Para confirmar la reducción de microglía observada mediante inmunotinción, procedimos a medir los niveles de ARNm de Cx3cr1, un gen homeostático altamente expresado por la microglía canónica. Este análisis mostró una reducción en la expresión del ARNm de Cx3cr1 de un 60% en el hipocampo de los animales que carecen de Caspasa 3 (*Figura 33E*; $p < 0,02$), confirmando así la presencia de menos células microgliales en esta región del cerebro.

Tras las diferencias en el número de microglía, el segundo enfoque experimental consistió en estudiar la morfología de la microglía, distinguiendo entre microglía homeostática, reactiva y ameboide, según el estado de activación (*Figura 33F*) en las mismas regiones cuantificadas previamente, corteza (*Figura 33G*) e hipocampo, distinguiendo aquí en CA1 (*Figura 33H*) y GD (*Figura 33I*).

En los controles, encontramos que aproximadamente el 18% de las células microgliales mostraban una morfología asociada a un estado reactivo primario, el 80% con morfología de reposo, y sólo el 1% con morfología ameboide en la formación del hipocampo y la corteza (*Figuras 33G-I*, barras negras). La delección de Caspasa 3 supuso una reducción significativa de la microglía con morfología reactiva en las tres regiones estudiadas, tanto en la corteza (*Figura 33G*; $p < 0,001$) como en el hipocampo (CA1; *Figura 33H*; $p < 0,01$, y GD; *Figura 33I*; $p < 0,001$), sin presentar diferencias en el resto de estados.

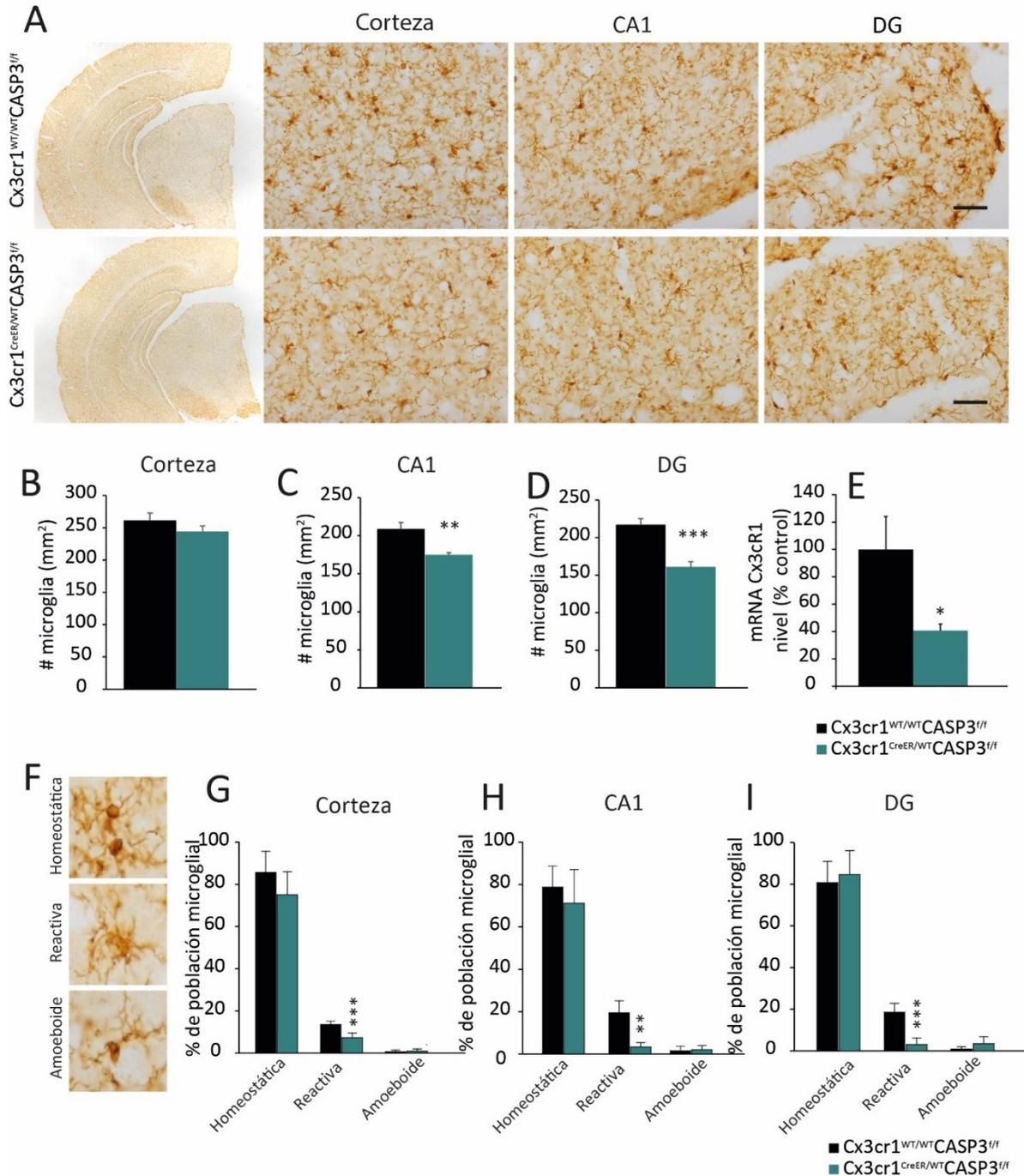


Figura 33. Efecto de la delección de la Caspasa 3 en la microglía: alteración del número y la morfología de la microglía. La inmunotinción de Iba (A) para la cuantificación de la microglía no reveló diferencias en la corteza ($p=0,31$) (B), pero sí en las dos zonas estudiadas del hipocampo, CA1 (~16%; $p<0,01$) (C) y GD (~26%; $p<0,001$) (D). Barra de escala = 50 μ m. También se mostró una reducción de ~60% en los niveles de ARNm de Cx3cr1 (E). Estudio morfológico de la microglía distinguiendo entre homeostática, reactiva y ameboide (F). En el control, encontramos aproximadamente un 18% de microglía en estado reactivo primario, un 80% en reposo y sólo un 1% con morfología ameboide en todas las regiones del cerebro estudiadas. Cuantificación de cada subpoblación de microglía expresada en porcentaje respecto al control en la corteza (G) y el hipocampo, distinguiendo CA1 (H) y GD (I). En la corteza, sólo se obtuvieron diferencias en la morfología reactiva, siendo la proporción mayor en los ratones condicionales respecto a los ratones control ($p<0,05$). Sin embargo, en las dos regiones del hipocampo estudiadas, se encontraron diferencias similares entre ellas al comparar el grupo estudiado, con un aumento significativo de la microglía homeostática en detrimento de la microglía reactiva (CA1: $p<0,001$ y GD: $p<0,001$). N=5, 6 ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,01$; ***, $p<0,001$ frente a los ratones de control.

RESULTADOS

Dado que la densidad de células microgliales en el hipocampo se redujo, nos preguntamos si esto también ocurría en los nichos neurogénicos.

La inmunofluorescencia de triple marcaje realizada en los sujetos controles mostró una co-localización de Caspasa 3 con las células Iba1⁺ en los nichos neurogénicos (*Figura 34A-B* hipocampo, *Figura 34D* bulbo olfatorio).

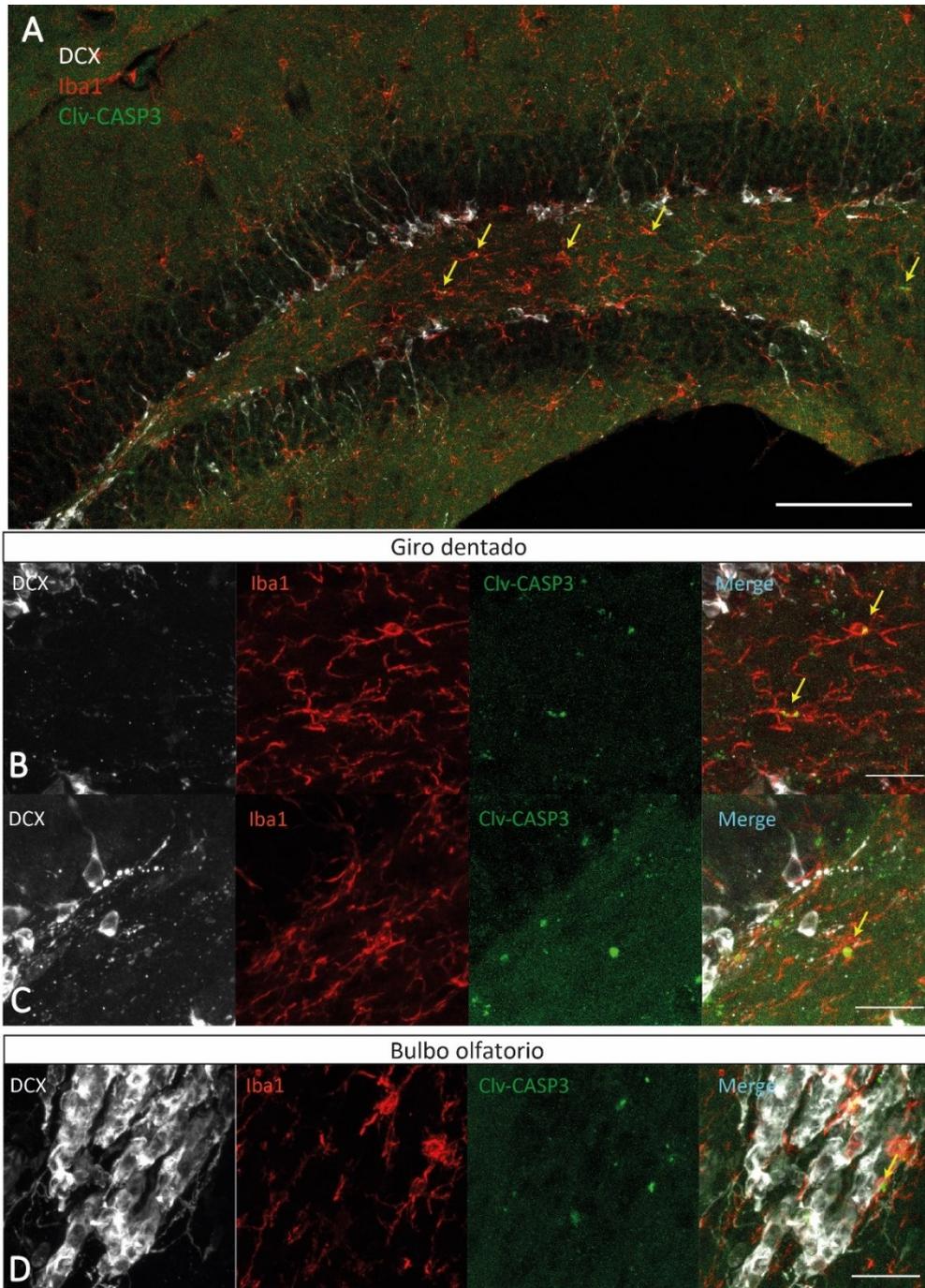
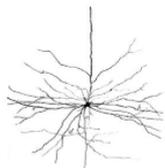


Figura 34. La microglía asociada a los nichos neurogénicos se co-localiza con el Casp3 activada. Imágenes representativas del ensayo de inmunofluorescencia tanto del giro dentado del hipocampo (A-C) como del bulbo olfatorio (D) de un ratón de control utilizando anticuerpos contra DCX, como marcador de neuronas recién nacidas (en gris), Iba1 como marcador general de microglía (en rojo) y Clv-Casp3 (en verde). Barra de escala de 200 μm (A) y barra de calibración de 20 μm (B-D).



RESULTADOS

Varios grupos han identificado una subpoblación de microglía que muestra una localización preferente en la sustancia blanca y en los nichos neurogénicos (**Artegiani et al., 2017; Li et al., 2019; Safaiyan et al., 2021**). Esta subpoblación de microglía se caracteriza por la expresión selectiva de diferentes marcadores, incluyendo Spp1, Cd11c y Lgals3 (**Mathys et al., 2017**). El gen Lgals3 codifica la galectina-3 (Gal3), que es expresada por diferentes formas de microglía activada pero no por la microglía homeostática (**Lalancette-Hébert et al., 2012**). Centrándonos en el GD, la estructura hipocampal en la que hemos observado mayor reducción de microglía reactiva en ausencia de Caspasa 3, realizamos estudios de inmunofluorescencia con el objetivo de estudiar la expresión de Gal3 asociada a esta posible nueva subpoblación microglial de los nichos neurogénicos anteriormente mencionada.

Las imágenes confocales representativas muestran claramente la disminución del número de células microgliales en el GD en los ratones condicionales con respecto a los controles (*Figura 35A*, tinción Iba1), además se puede observar que la microglía marcada con Gal3 también está disminuida en un 62% en el ratón condicional (*Figura 35A*, tinción Gal3 y *Figura 35B*; $p < 0.001$).

RESULTADOS

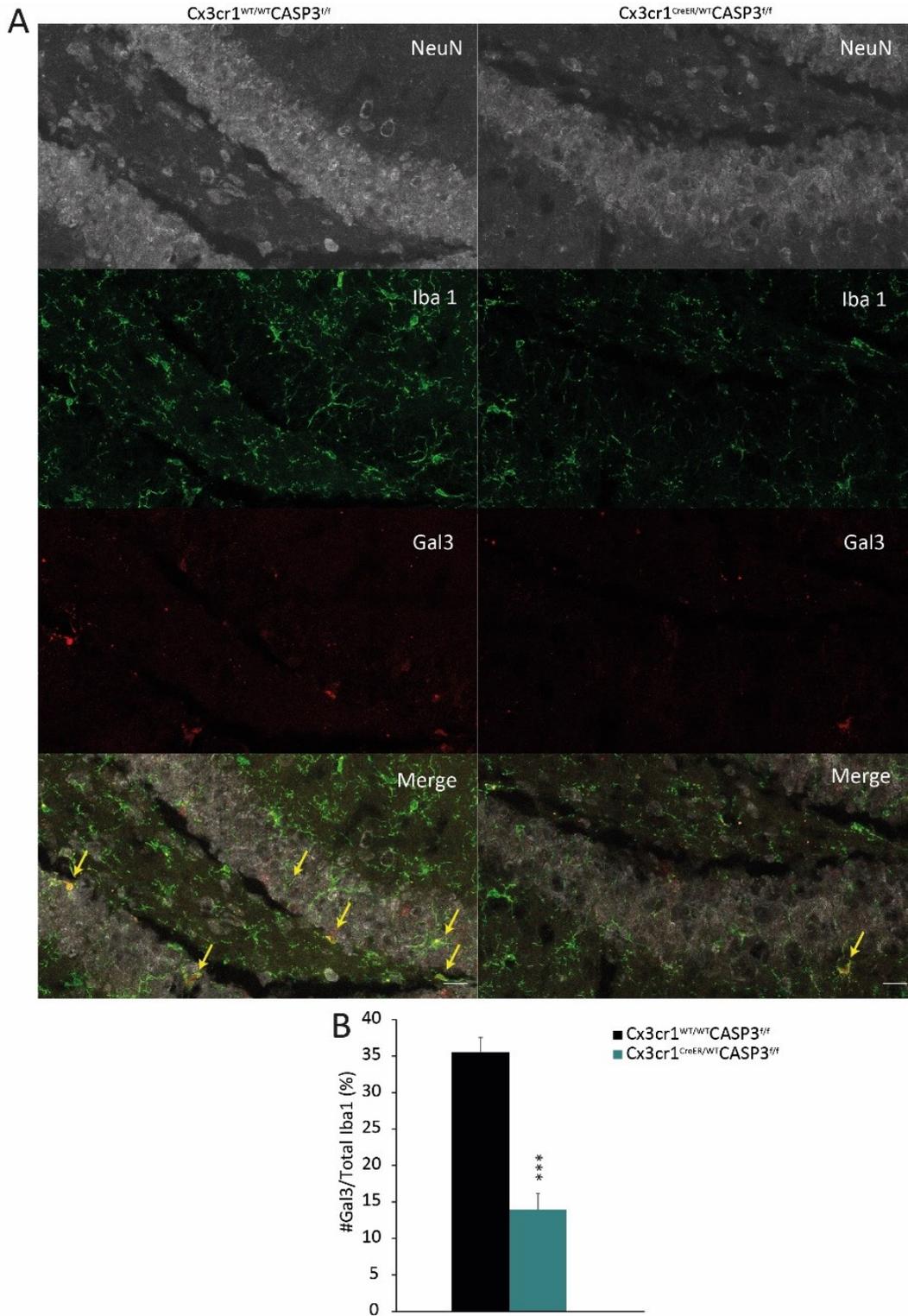
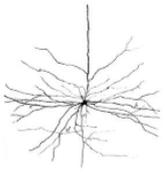


Figura 35. Efecto de la supresión de la Caspasa 3 en la expresión de Gal3 en la microglía del GD. (A) Imágenes confocales representativas etiquetando NeuN como marcador neuronal (en gris), Iba1 como marcador general de microglía (en verde) y Gal3 como marcador de PAM (en rojo). (B) Cuantificación de la microglía positiva a Gal3 en el GD del hipocampo en los ratones control y condicional. N=5, 6 ratones/grupo. ***, $p < 0,001$ frente a los ratones de control. Barra de escala = 20 μ m.

SIII.3 DISMINUCIÓN DE ACTIVIDAD FAGOCÍTICA MICROGLIAL EN AUSENCIA DE CASPASA 3

Los cambios morfológicos mostrados en la microglía carente de Caspasa 3, podrían indicar una disminución de su capacidad fagocítica. Para comprender mejor esta cuestión, se midió la capacidad fagocítica de la microglía, definida como el número medio de bolsas fagocíticas por microglía (**Díaz-Aparicio et al., 2020**) (Figura 36A-D). La capacidad fagocítica se redujo significativamente por encima del 65% en los ratones condicionales en comparación con los controles (Figura 36E; $p < 0,02$). Esta posible disminución de la capacidad fagocítica de la microglía carente de Caspasa 3 podría ir acompañada de una alteración en el mecanismo molecular de la fagocitosis. De hecho, mediante RT-PCR, encontramos una disminución en la expresión del receptor fagocítico MerTK (Figura 36F; $p < 0,02$) y de Rab7, un componente esencial del sistema de formación de fagosomas (Figura 36G; $p < 0,05$).

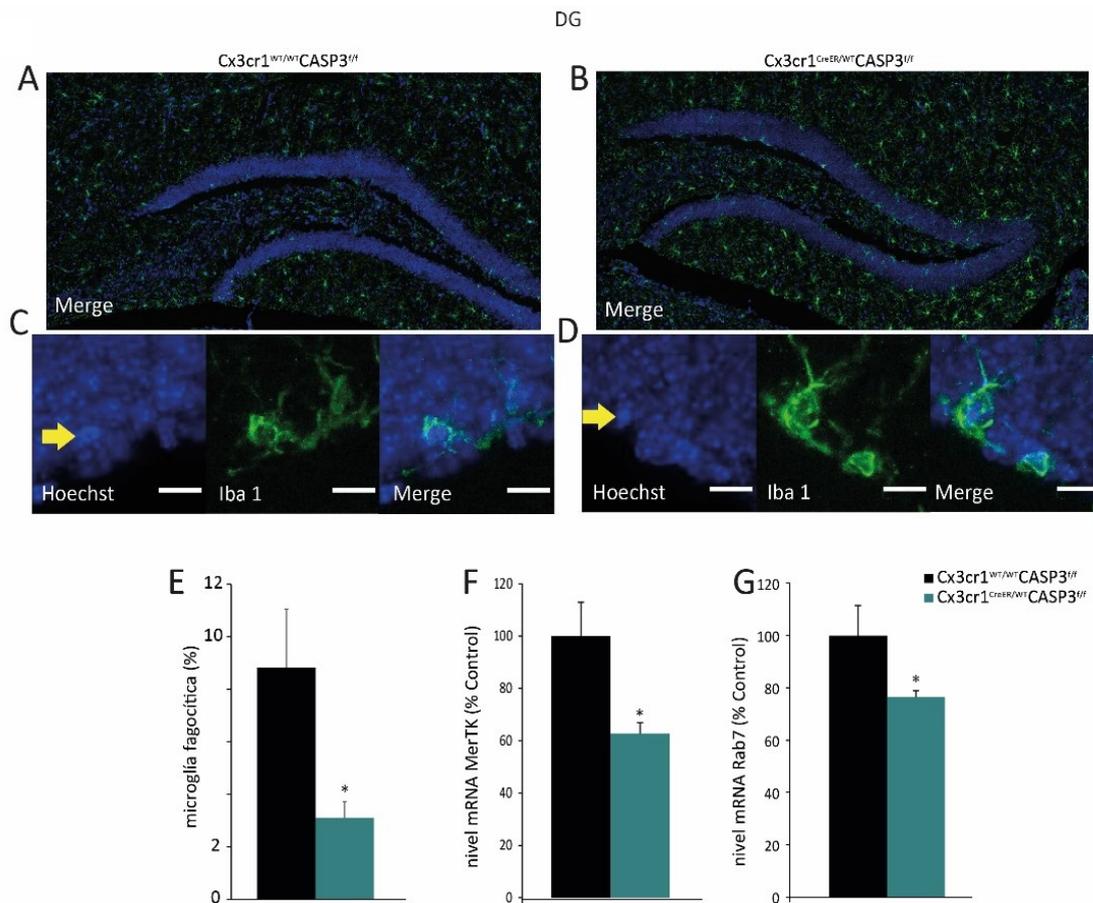


Figura 36. La supresión de Caspasa 3 provocó una disminución de la capacidad fagocítica microglial. Inmunofluorescencia de Iba1 en ratones Cx3cR1^{WT/WT}-CASP3^{fl/fl} (A y C) y en Cx3cR1^{Cre/WT}-CASP3^{fl/fl} (B y D). Barra de escala = 10 μ m. Medida de la capacidad fagocítica definida en porcentaje como el número medio de bolsas fagocíticas por microglía (E). La capacidad fagocítica se redujo significativamente por encima del 65% en los ratones condicionales en comparación con los controles ($p < 0,02$). Medición del ARNm de los niveles de los marcadores fagocíticos, MerTK (F) ($p < 0,02$) y Rab7 (G) ($p < 0,05$) expresados como porcentaje del control. N=5, 6 ratones/grupo. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$ frente a los ratones de control.

SII.4 EFECTO DE LA DELECIÓN DE CASPASA 3 EN LA FORMACIÓN DE NUEVAS NEURONAS EN EL GIRO DENTADO

Como mencionamos en el apartado de introducción, la microglía es uno de los componentes celulares principales implicados en la neurogénesis hipocampal. Por tanto, era lógico pensar que, tras los efectos observados en la microglía al delecionar la Caspasa 3, la neurogénesis pudiera verse afectada. Tras la delección de Caspasa 3 en la microglía, hemos encontrado menos células microgliales cerca del nicho neurogénico en el hipocampo y un estado menos activo de estas células microgliales. Esto sugiere que Caspasa 3 es esencial para este proceso.

El GD es la región del hipocampo donde se modula principalmente la neurogénesis, por lo que nos preguntamos si la alteración de la microglía en el modelo condicional en esta región altera el proceso neurogénico.

Utilizando inmunofluorescencia, encontramos una disminución de las neuronas neurogénicas marcadas con DCX (*Figura 37A*) en los sujetos condicionales. La cuantificación de las neuronas DCX⁺ mostró una disminución del 32% en los ratones condicionales en comparación con los controles (*Figura 37B*; $P < 0,001$). Para confirmar esta observación, se estimó el número total de DCX⁺ por hipocampo septal utilizando un enfoque estereológico. El número de neuronas recién nacidas disminuyó un 31% en los ratones condicionales ($Cx3cr1^{WT/WT} CASP3^{f/f}$: 53.608 ± 2587 células DCX⁺, $n=6$; $Cx3cr1^{WT/CRE} CASP3^{f/f}$: 36.953 ± 3946 células DCX⁺, $n=7$; $p < 0,001$) (*Figura 37D*). Además, cuando medimos la expresión de DCX en el tejido del hipocampo, se observó una disminución de los niveles de ARNm de DCX (*Figura 26E*; $p < 0,05$). Este resultado fue consistente con la disminución de las neuronas recién nacidas en los ratones condicionales.

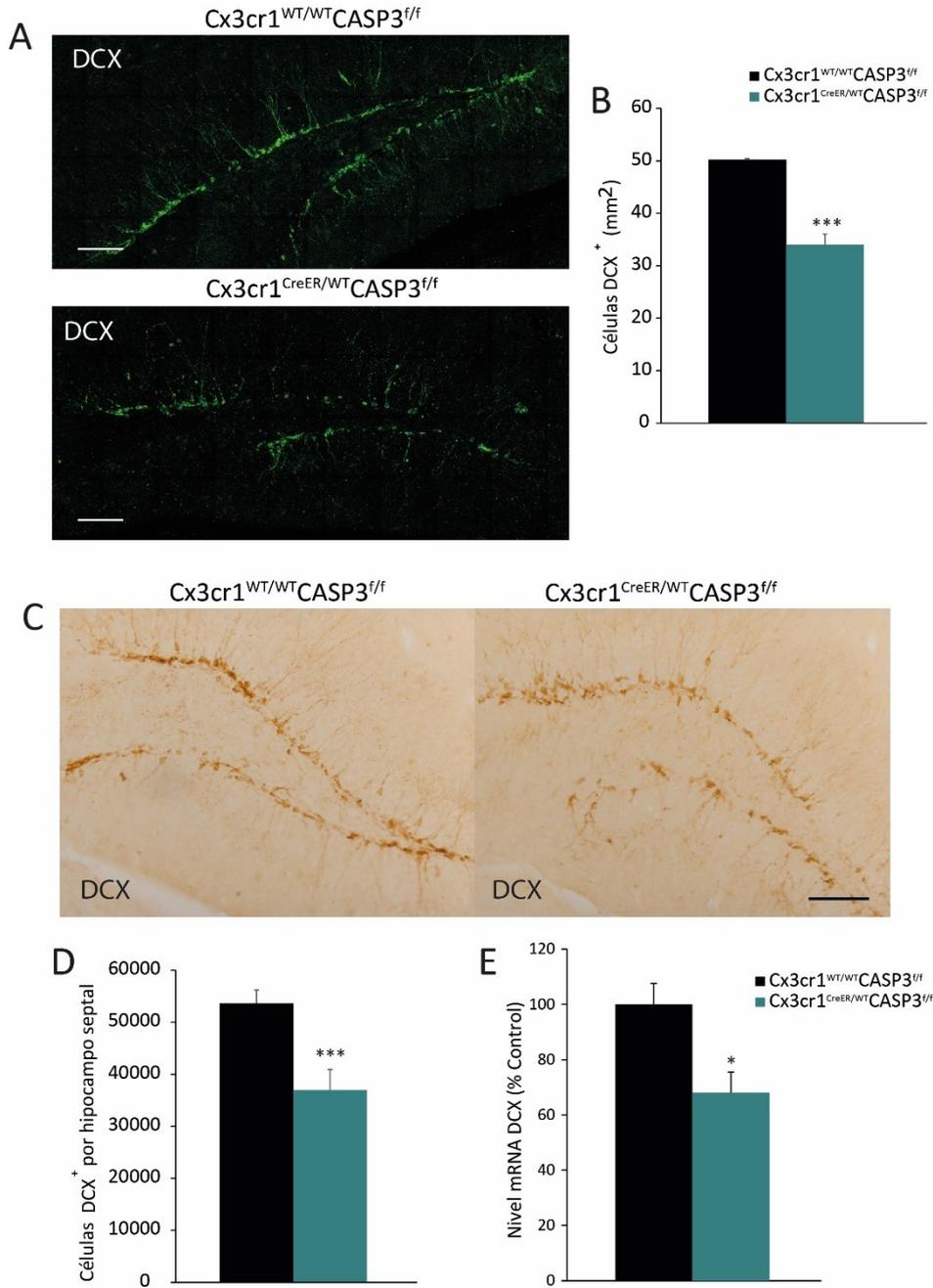
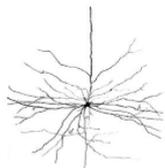


Figura 37. La supresión de la caspasa 3 provocó una disminución de las neuronas recién nacidas en el giro dentado del hipocampo. Inmunofluorescencia de DCX en el hipocampo de ratones *Cx3cr1*^{WT/WT}-*CASP3*^{f/f} (imagen superior) y en *Cx3cr1*^{Cre/WT}-*CASP3*^{f/f} (imagen inferior) (A) Barra de escala=100 μ m. La cuantificación de las neuronas neurogénicas marcadas con DCX en el hipocampo mostró una disminución de 32% en los ratones condicionales en comparación con los controles ($p < 0,001$) (B) Los datos se expresan como el número de células DCX⁺ por mm². N=3/3 ratones/grupo. La inmunohistoquímica de DCX en el hipocampo (C) y el análisis estereológico (D) del número total de células DCX⁺ revelaron una disminución de un 31% de neuronas neurogénicas en los ratones condicionales (*Cx3cr1*^{WT/WT}-*CASP3*^{f/f}: 53.608 \pm 2587 células DCX⁺, n=6; *Cx3cr1*^{Cre/WT}-*CASP3*^{f/f}: 36.953 \pm 3946 células DCX⁺, n=7; $p < 0,001$). La medición de los niveles de DCX por ARNm en el hipocampo también mostró una disminución en los ratones condicionales ($p < 0,05$). N=5/6 ratones/grupo (E). *, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$ frente a los ratones de control.



SII.5 EFECTO DE LA DELECCIÓN DE CASPASA 3 EN LA CONDUCTA

SII.5.1 EVALUACIÓN DEL COMPORTAMIENTO MOTOR Y ANSIEDAD- LOS RATONES CX3CR1-CASP3KO MUESTRAN UNA ACTIVIDAD LOCOMOTORA TÍPICA

Estudios recientes indican que las neuronas recién generadas contribuyen al aprendizaje y la memoria dependientes del hipocampo, entre otras funciones (*Anacker y Hen, 2017; Suárez-Pereira y Carrión, 2015; Miller y Sahay, 2019*).

Para estudiar las capacidades cognitivas de nuestro modelo de ratón, primero necesitamos saber si había alguna alteración motora y/o de ansiedad. Para ello, se realizó un estudio de campo abierto (*Figura 38A*). No se encontraron diferencias ni en el tiempo de permanencia en el borde de la arena (*Figura 38B; p=0,78*), ni en el tiempo de descanso (*Figura 38C; p=0,18*) ni en el número de entradas en el centro de la arena (*Figura 38D; p=0,93*). Estos datos indican que los ratones condicionales mostraron niveles similares de actividad en el campo abierto en comparación con sus compañeros de camada control, lo que sugiere bajos niveles de ansiedad en estos animales.

En segundo lugar, nos preguntamos si la actividad normal también iba acompañada de una coordinación motora y un equilibrio adecuados. Para responder a esto, realizamos la prueba del rotarod que no mostró diferencias entre los grupos estudiados, ni en el número de caídas (*Figura 38E*) ni en el tiempo de latencia en la primera caída (*Figura 38F; p=0,32*). Finalmente, se realizó la prueba de enterramiento de canicas, otra prueba típica para medir el comportamiento ansioso (*Figura 27G*); en esta prueba, los ratones experimentales enterraron un número similar de canicas que los controles (*Figura 27H; p=0,13*) indicando así que el comportamiento era normal en los ratones condicionales.

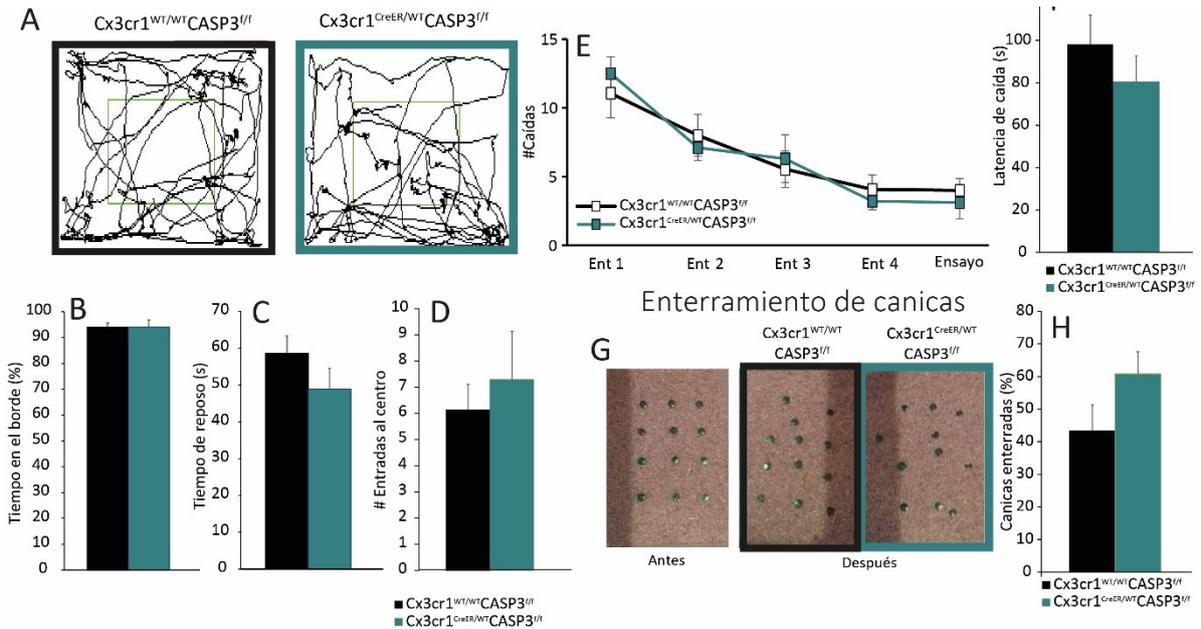


Figura 38. La supresión de la Caspasa 3 no alteró la función locomotora. Se registró la actividad espontánea en el campo abierto y sus trazos (A) en los grupos experimentales. No se encontraron diferencias ni en el tiempo de permanencia en el borde de la arena (B; $p=0,782$), ni en el tiempo de descanso (C; $p=0,183$) ni en el número de entradas en el centro de la arena (D; $p=0,933$). Se realizó la prueba del rotarod para saber si la actividad normal se acompañaba también de una adecuada coordinación motora y equilibrio (E), y no se encontraron diferencias ni en el número de caídas (E) (Ent: entrenamiento) ni en el tiempo de latencia en la primera caída (F; $p=0,32$). Se realizó la prueba de enterramiento de canicas (G). Los resultados fueron similares en ambos grupos (H; $p=0,129$). Los datos se expresan como media \pm SEM de $n=15-10$ ratones/grupo.

SII.5.2 EVALUACIÓN COGNITIVA - LOS RATONES CX3CR1-CASP3KO MUESTRAN DEFICIENCIAS EN EL COMPORTAMIENTO COGNITIVO

Una vez que observamos que el comportamiento motor no estaba alterado y que no presentaban signos de ansiedad en los ratones condicionales, se diseñaron diferentes paradigmas conductuales para investigar sus capacidades cognitivas. Para estudiar la memoria espacial dependiente del hipocampo, utilizamos el paradigma de discriminación de brazos nuevos en el laberinto Y (Figura 39A). Esta prueba se basó en la preferencia inherente de los ratones por explorar un entorno novedoso en lugar de uno familiar. El porcentaje de triples alternancias espontáneas fue similar en todos los grupos experimentales (Figura 39B). Por lo tanto, la memoria de trabajo parece no verse afectada cuando se deletiona Caspasa 3 en la microglía. Curiosamente, el grupo de ratones experimentales mostró una disminución significativa en el porcentaje de veces que visitó el brazo novedoso (Figura 28C) después de 1h del bloqueo del brazo, siendo esta diferencia de aproximadamente un 50% en comparación con los grupos de control (Figura 39D; $p<0,01$).

Para profundizar en el déficit de memoria encontrado en el grupo experimental, se realizó la prueba ORM (Figura 39E). Los resultados mostraron que el grupo experimental tenía

RESULTADOS

menos preferencia por el objeto nuevo que por el familiar, 1 hora después de la sesión de entrenamiento. En este caso, el índice de entrenamiento fue similar entre los grupos estudiados (Figura 39F; $p=0,218$). Por lo tanto, los ratones deficientes en Caspasa 3 condicional muestran un deterioro en el índice de adquisición de la memoria a corto plazo (STM) en comparación con el grupo control (Figura 28G; $p<0,05$). Este déficit de memoria coincidió con el encontrado en la tarea del laberinto Y.

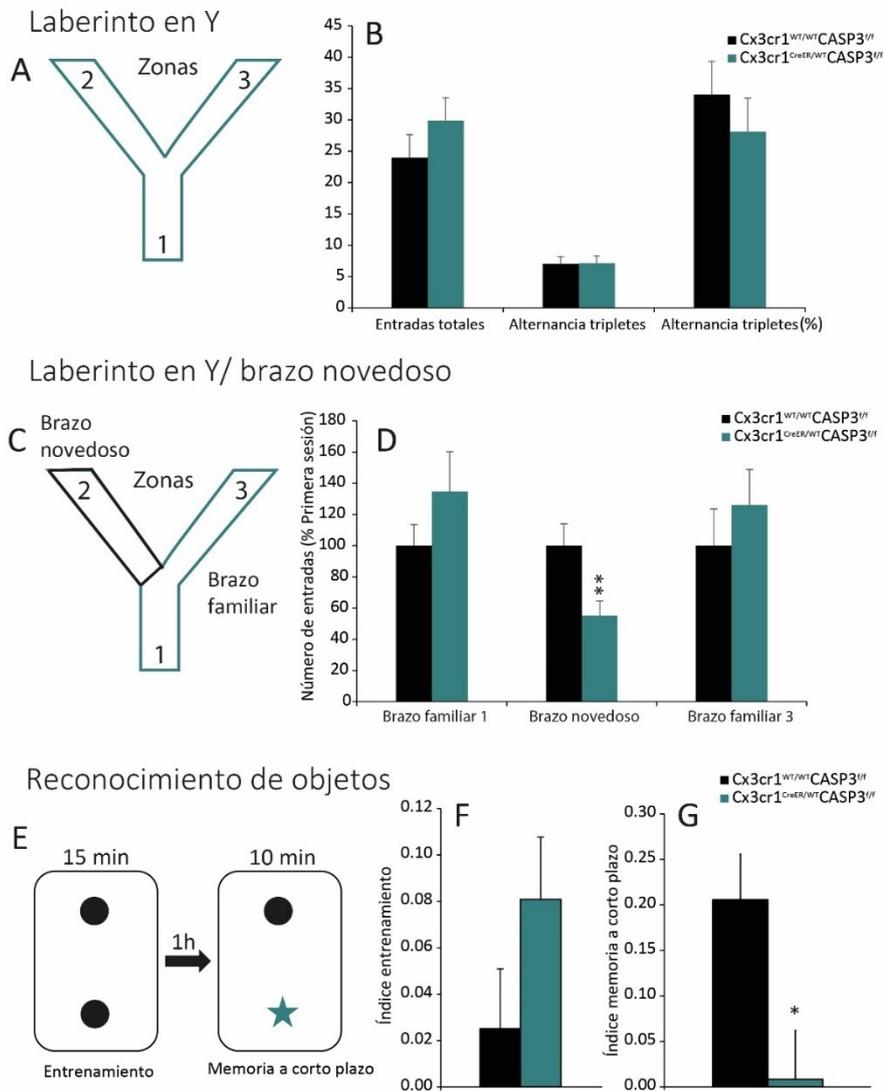
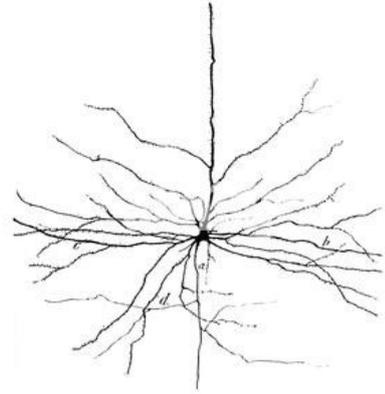
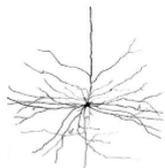


Figura 39. La supresión de Caspasa 3 en la microglía deteriora la función cognitiva. Se utilizó la prueba del laberinto en Y para evaluar la memoria espacial dependiente del hipocampo (A), basada en la preferencia innata por explorar el nuevo entorno. El porcentaje de alternancias triples espontáneas fue similar en ambos grupos (B). Sin embargo, se observó una disminución significativa en el porcentaje de veces que visitaron el brazo novedoso tras 1h de bloqueo en los animales experimentales (C) en comparación con los controles, siendo la diferencia de aproximadamente un 50% (D; $p<0,01$). En la prueba de reconocimiento de objetos (E), los sujetos experimentales mostraron menos preferencia por el objeto novedoso (G; $p=0,037$) 1 h después de la sesión de entrenamiento (F; $p=0,218$). $N=8$, 8 ratones/grupo. *, $p<0,05$; **, $p<0,001$ frente a los ratones de control.

DISCUSIÓN





CAPÍTULO I.

DELECIÓN DE CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Nuestro trabajo revela que la ausencia de Caspasa 8 durante la embriogénesis supone una reducción significativa de los niveles de microglía a E13.5. Estos hallazgos junto a la ausencia de cambios significativos en los niveles de marcadores microgliales a E11.5 parece revelar un problema en el mantenimiento y supervivencia de dichas células nerviosas en ausencia de Caspasa 8.

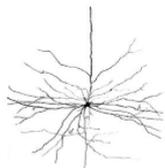
Dado que el periodo de letalidad tras la delección homocigótica de Caspasa 8 se ha establecido en torno al día E10.5 de gestación (*Zhang et al., 1998; Varfolomeev et al., 1998; Vandenabeele et al., 2012; Dillon et al., 2014; Kavanagh et al., 2015; Dillon et al., 2016*), realizamos los primeros experimentos con embriones a E11.5, E12.5 y E15.5. Debido a que las mayores diferencias se encontraron entre E11.5 y E13.5, continuamos tan solo con esas etapas clave como objetivo de nuestro estudio.

En primer lugar, la apariencia física de los embriones en el momento de la extracción, correspondía con los datos publicados por otros investigadores (*Zhang et al., 1998; Varfolomeev et al., 1998; Vandenabeele et al., 2012; Dillon et al., 2014; Kavanagh et al., 2015; Dillon et al., 2016*). Cabe destacar que el trabajo con embriones Caspasa 8 *KO* supone un reto técnico debido no solo al pequeño tamaño, sino también a la dificultad de manipulación de los tejidos por a la deficiente conservación tisular.

La expresión ubicua y amplia de Caspasa 8 en el embrión control proporciona una visión clara de la enorme implicación que debe tener dicha proteasa durante el desarrollo, algo que ya se esperaba debido al hallazgo de la letalidad embrionaria en su ausencia, así como de las funciones en procesos biológicos como la proliferación y diferenciación celular mencionado (*Los et al., 1999; Sordet et al., 2002; Kang et al., 2004; Rébé et al., 2007*). Todo ello no hace más que apoyar los papeles más allá de apoptosis de la Caspasa 8 y su importancia en el desarrollo.

Las primeras células en colonizar el cerebro durante la embriogénesis son las microgliales, dada esta temprana colonización es lógico pensar que debe cumplir funciones esenciales en la formación del SNC y contribuir su correcto funcionamiento (*Reemst et al., 2016*). Entre las funciones claves asociadas a la microglía está su implicación en la neurogénesis y la gliogénesis, la muerte celular (*Swinnen et al., 2013*), la angiogénesis, la proliferación y poda axonal y la sinaptogénesis (*Squarzoni et al., 2014; Reemst et al., 2016*).

Así mismo, debido a la función moduladora de la microglía que desarrolla la Caspasa 8 (*Burguillos et al., 2011*), quisimos estudiar su estado en ausencia de la proteasa en cuestión. En



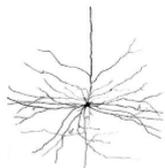
DISCUSIÓN

nuestro trabajo hemos mostrado que la delección completa de Caspasa 8 supone una disminución significativa de los niveles de microglía homeostática a E13.5, observado tanto en el marcaje y cuantificación de Iba1 mediante inmunofluorescencia como en el estudio de los marcadores Tmem119, CX3CR1 y CD11b por RT-PCR. Podemos suponer que este hallazgo no es consecuencia de un problema de migración, ya que a E11.5 no observamos cambios significativos en los niveles de microglía homeostática. Dado que no parece ser un problema de migración, pensamos que pudiera ser consecuencia de fallo en la proliferación o supervivencia. Los niveles de los marcadores proliferativos CSF1R y Ki67 mostraron un descenso a E13.5 pero no a E11.5, lo que, efectivamente podría ser consecuencia de un problema más tardío de proliferación y supervivencia.

Si bien, estos datos serán confirmados en un futuro con los análisis de citometría de flujo realizados tanto con embriones como con los sacos vitelinos, con el objetivo de confirmar que la reducción de microglía no se debe a un problema en la migración en ausencia de Caspasa 8 desde el saco vitelino al cerebro en desarrollo como previamente ha sido descrito (*Alliot et al., 1991*).

CSF1R, es un regulador clave de la proliferación, supervivencia y funciones de las células mieloides (*Dai et al., 2002; Ginhoux et al., 2010; Erblich et al., 2011; Elmore et al., 2014*) y puede activarse mediante la unión de CSF1 y la interleucina IL-34. La mutación homocigótica de CSF1R conlleva una reducción dramática de la microglía en el cerebro, encontrándose una población residual con morfología ameboidea asociada a los vasos sanguíneos (*Oosterhof et al., 2019*). Dado que la expresión de CSF1R se ve reducida a E13.5 podemos suponer que tiene que ver con la reducción de microglía que se observa a este tiempo. Aun así, sería interesante estudiar qué relación existe entre Caspasa 8 y CSF1R para descartar una regulación a la baja del receptor por la ausencia de Caspasa 8.

Sorprendentemente, un hallazgo compartido a ambos tiempos embrionarios estudiados es la reducción significativa de la expresión del marcador fagocítico MerTK. A E13.5 sería lógico dada la reducción de los niveles de microglía. Sin embargo, a E11.5 no podemos atribuirle esta hipótesis, por lo que parece estar relacionado con una función específica de MertK y su actividad. Mertk es un marcador asociado a microglía homeostática y a una función fagocítica (*Nomura et al., 2017*). El paso de microglía homeostática a DAM conlleva una reducción de los genes homeostáticos y una regulación al alza de los asociados a la microglía DAM (*Keren-Shaul et al., 2017; Mathys et al., 2017*), perdiendo las funciones protectoras y reduciendo la capacidad fagocítica (*Galatro et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017*). Dado el descenso de microglía homeostática a E13.5, así como los niveles reducidos de Mertk en ambos tiempos, quisimos estudiar si la microglía residual se encontraba más activada como consecuencia del daño

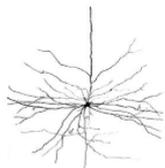


DISCUSIÓN

provocado por la delección. Gal3 pertenece a una familia de lectinas animales caracterizadas por ser moléculas reguladoras de la diferenciación que participan en una variedad de funciones biológicas que incluyen inmunomodulación, embriogénesis, angiogénesis, migración celular, cicatrización de heridas y apoptosis (*Nangia-Makker et al., 2000; Sundblad et al., 2011*). Aunque Gal3 se identificó por primera vez en macrófagos periféricos (*Sundblad et al., 2011*), recientemente se ha utilizado cada vez más como un marcador de activación microglial (*Lalancette-Hébert et al., 2012*). Las investigaciones del grupo de Lalancette-Hébert mostraron un aumento de Gal3 en un subconjunto de células microgliales activadas después de un accidente cerebrovascular, lo que podría sugerir que Gal3 desempeña un papel fundamental en la mediación de activación y proliferación microglial inducida por lesiones. Cabe destacar que Gal3 es abundante en microglía activada, no expresándola las células en reposo (*Lalancette-Hébert et al., 2012*). A E13.5 observamos un descenso de los marcadores moleculares de la microglía DAM revelado por el estudio por RT-PCR de Clec7a y Gal3. El marcaje mediante inmunofluorescencia realizado apoyó el descenso observado en dichos marcadores en ausencia de Caspasa 8 a E13.5. Así mismo observamos una reducción significativa de TREM2, lo que podría ser explicación de la falta de señalización de Gal3 (*Wang et al., 2015; Lee et al., 2018; Boza-Serrano et al., 2019*). A este tiempo, sería lógico pensar que dicho descenso no debe ser consecuencia de que haya menos activación, sino a una baja total de los niveles de microglía. Cabe destacar que Clec7a es un marcador de microglía DAM que ha sido implicado a remodelación y reparación tisular a través de aumentos de receptores / secretores que promueven la angiogénesis, la eliminación eficiente de desechos y la resolución de las respuestas inflamatorias (*Jiao et al., 2015*). En nuestros estudios los *KO* experimentan un descenso significativo de Clec7a con respecto a los controles a E13.5. Estos resultados podrían asociarse a la deficiente formación y conservación tisular en ausencia de Caspasa 8.

A E11.5 tan solo observamos cambios en la expresión de Gal3, lo que, *a priori* debería ir de la mano de un aumento de TREM2 y de Clec7a, así como una reducción de los genes de microglía homeostática para poder suponer una mayor proporción de DAM (*Keren-Shaul et al., 2017*).

En conjunto los resultados obtenidos a E11.5 no podrían explicarse por un aumento de microglía DAM. Esta falta de concordancia en los resultados nos hace proponer una hipótesis alternativa a la causa del aumento de expresión de Gal3. Esta galectina es liberada no solo por la microglía sino también por los macrófagos y astrocitos (*Sundblad et al., 2011*), por tanto, pensamos que ante la delección de Caspasa 8 se pueda estar experimentando un fallo en la barrera hematoencefálica, que causaría la infiltración de macrófagos productores de Gal3, o bien, que sean los astrocitos los posibles productores, para comprobar esta hipótesis se



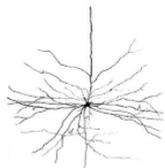
DISCUSIÓN

deberían realizar experimentos futuros con marcadores específicos de astrocitos y macrófagos con el fin de estudiar su colocalización con Gal3. Así mismo, sería interesante estudiar morfológicamente la microglía a E11.5.

Volviendo a los niveles reducidos de MertK a E11.5 que no podían ser explicados por la reducción de microglía homeostática, el aumento de Gal3 si podría ser la posible consecuencia del dicho descenso, ya que, como mencionamos con anterioridad, el paso a microglía DAM supone pérdida de capacidad fagocítica (*Galatro et al., 2017; Keren-Shaul et al., 2017*). Sin embargo, al igual que concluimos con los valores anteriormente discutidos, tendríamos que confirmar realmente que se trata de DAM a E11.5.

Dentro de las funciones esenciales de la microglía está la de garantizar la supervivencia del resto de células del SNC (*Ginhoux et al., 2010*). Cuando las neuronas invaden en el cerebro las únicas células presentes son las microgliales (*Pont-Lezica et al., 2014*) (véase figura 1 de la introducción) por ello, y dado los resultados obtenidos con respecto a la microglía, quisimos estudiar el estado del resto de población celular. Encontramos una reducción significativa en ausencia de Caspasa 8 en comparación con los controles tanto del marcador de doblecortina (DCX), como de nestina, en ambos tiempos embrionarios estudiados. DCX es una proteína asociada a microtúbulos usada como marcador característico de neurona inmadura. Está presente en neuroblastos y neuronas jóvenes en migración (*Francis et al., 1999; Gleeson et al., 1999*). DCX está relacionada fundamentalmente con la migración celular, la axogénesis y la sinaptogénesis. Su expresión comienza, con cierto solapamiento, cuando termina el de nestina, tras la especificación neuronal (*Kronenberg et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2005; Steiner et al., 2006*), terminando con el inicio de la expresión de NeuN, siendo un marcador de neurona madura (*Brandt et al., 2003; Brown et al., 2003; Couillard-Despres et al., 2006*). La nestina es un marcador relacionado con el crecimiento del axón, un precursor de nuevas neuronas (*Yamaguchi et al., 2000*). El descenso de estos marcadores posiblemente esté ligado, no solo a la supervivencia sino también a la implicación esencial de microglía en la neurogénesis, por lo que su pérdida a E13.5 podría conllevar consecuencias en dicho proceso (*Swinnen et al., 2013*).

Dado que Gal3 supone inducción de muerte celular (*Nomura et al., 2017*), el aumento de la expresión observado a E11.5 en ausencia de Caspasa 8 podría desencadenar la reducción de la expresión de DCX y Nestina como consecuencia del aumento de fagocitación mediada por la opsonización llevada a cabo por Gal3. Sin embargo, la disminución significativa a E13.5 de DCX y nestina, apoyados así mismo con una reducción del marcaje mediante inmunofluorescencia, no podría ser explicado de la misma manera. En este tiempo sería más lógico pensar que se debe a la reducción de microglía, la cual, en condiciones fisiológicas secreta factores tróficos como CSF1. La señalización CSF1-CSF1R regulan el mantenimiento y la supervivencia tanto de la



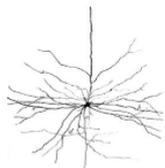
DISCUSIÓN

microglía como de las nuevas neuronas (*Ginhoux et al., 2010*). Así mismo, podría deberse a los niveles reducidos de CSF1R y Ki67 antes mencionados. Sin embargo, los niveles de expresión del precursor GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*) no se ven alterados en ausencia de Caspasa 8 en ninguno de los tiempos estudiados. De manera común, GFAP se emplea como marcador de astrocitos reactivos maduros en el cerebro, aunque también se expresa en precursores neurales, es decir, se expresa tanto en glía como en neuronas de nueva generación. Los resultados obtenidos en los niveles de GFAP pensamos podría estar relacionado con un mecanismo compensatorio. En los estudios publicados se ha asociado la delección de Caspasa 8 con un problema vascular (*Dillon et al., 2016*), dado que los astrocitos están en enorme contacto con los vasos sanguíneos puede que estén intentando reducir el daño experimentado.

El papel pro-supervivencia asociado a la Caspasa 8 se ha asociado a la supresión de la muerte necroptótica (*Kang et al., 2008; Oberst y Green, 2011*), por ello, como mencionamos con anterioridad, la muerte de los sujetos *KO* en Caspasa 8 se debe a un aumento de dicha vía de muerte (*Varfolomeev et al., 1998; Harriman et al., 2010; Kavanagh et al., 2015*).

Los datos de RT-PCR de las quinasas implicadas en la necroptosis no revelan una participación de dicha vía de muerte debido a la incapacidad de detectar las formas activas mediante esta técnica. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante Western Blot de MLKL-P, apoyados por el análisis cualitativo del marcaje de MLKL-P mediante inmunofluorescencia, revelan una expresión similar en ausencia y presencia de Caspasa 8 a E11.5 lo que revela que la participación de la necroptosis a nivel del SNC está jugando un papel fisiológico, tal y como algunos autores han demostrado (*Vanlangenakker et al., 2012*). Algo que concuerda con los experimentos llevados a cabo mediante delección selectiva de Caspasa 8 en cerebro, que llevaron a concluir que los problemas asociados a este tejido en ausencia de Caspasa 8 fueron consecuencia y no causa de la muerte (*Dillon et al., 2016*). Siguiendo con la idea de las investigaciones de (*Dillon et al., 2016*), todos los fallos podrían ser secundarios al fallo vascular. Por ello, en nuestro estudio, dado que nos centramos en cerebro, pensamos que el papel de la necroptosis juega un papel fisiológico y no está provocando en sí la muerte del embrión. Esto es algo que concuerda con los estudios en los que la delección selectiva de Caspasa 8 en el cerebro no conllevó letalidad. Con todo ello, podríamos pensar que las células localizadas en el cerebro no son propensas a la muerte necroptótica (*Dillon et al., 2016*).

El último paso fue estudiar el estado inflamatorio en ausencia de Caspasa 8. La vía necroptótica supondría un aumento de la liberación de factores inflamatorios como IL-1 β , TNF α e iNOS, entre otros (*Chao et al., 1950*). Por ello, realizamos el estudio de expresión de ARNm de los dichos marcadores inflamatorios.



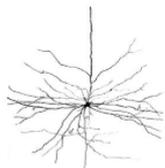
DISCUSIÓN

A E11.5, como hemos mencionado anteriormente, no se observan diferencias a nivel de necroptosis entre los sujetos *KO* y los controles, con lo cual, parece lógico no encontrar diferencias en los niveles de IL-1 β y TNF α entre los grupos. Sin embargo, los valores de iNOS experimentaron una reducción significativa en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles.

A E13.5 la afectación a nivel inflamatorio fue mayor, presentando un aumento significativo de iNOS e IL1 β en ausencia de Caspasa 8 con respecto a los controles y una reducción de TNF α ante la delección de dicha proteasa.

Para poder dar una posible explicación a los niveles de marcadores inflamatorios, cabe destacar que, además de sus importantes funciones en la respuesta inflamatoria, las citoquinas también desempeñan otras funciones en numerosos procesos biológicos como la embriogénesis, la hematopoyesis y la angiogénesis, así como en diferentes procesos celulares como la mitosis, la diferenciación, la migración e incluso la muerte (**Carrodeguas-González et al., 2022**). Dos características funcionales principales de las citoquinas son la pleiotropía, ya que una misma citoquina puede tener diferentes efectos biológicos y la redundancia, debido a que varias citoquinas pueden contribuir al desarrollo de un mismo efector en las células. Otro aspecto a tener en cuenta es que las citoquinas pueden actuar en lo que se conoce como cascada de amplificación, estimulando la producción de otras citoquinas ampliando los efectos biológicos o desarrollando un efecto antagonista, regulando la respuesta o la intensidad mediante feedback negativo. Por todo ello, nos encontramos con un sistema complejo en el que la acción de cada molécula está estrechamente regulada positiva o negativamente por moléculas del mismo sistema y que, además, cuando alguna citoquina está ausente, sus funciones pueden ser sustituidas total o parcialmente por otras.

En este sentido, TNF es una citoquina implicada en la activación de la apoptosis. Durante muchos años ha sido considerada como una citoquina mediadora de estímulos perjudiciales que inducen la muerte embrionaria y las anomalías estructurales congénitas (**Toder et al., 2003**). En primer lugar, que sea capaz de inducir la apoptosis no tiene por qué ir de la mano de un papel perjudicial durante la embriogénesis dada la importancia de la muerte celular para garantizar la homeostasis, tal y como hemos hablado en apartados anteriores. Además, que el embrión se desarrolle normalmente depende no sólo de los mecanismos que regulan el desarrollo embrionario, sino también de los mecanismos que actúan para resistir y reparar las lesiones en el embrión debido a estímulos maternos perjudiciales o a la exposición a estrés embriopático ambiental. En este sentido se ha demostrado que TNF α puede activar algunos de estos mecanismos de defensa (**Toder et al., 2003**). El hecho que el TNF α no sólo puede iniciar, si no



DISCUSIÓN

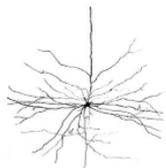
también prevenir la apoptosis ha obligado a cuestionar el concepto de que el TNF α es inequívocamente perjudicial para el desarrollo embrionario.

Parece que el doble papel de esta citoquina durante la embriogénesis puede ser la de prevenir el nacimiento de crías con anomalías estructurales. En términos sencillos, TNF α potenciará la señalización de muerte para matar al embrión si los daños desencadenados por estímulos perjudiciales pueden culminar en anomalías estructurales, y estimulará mecanismos de protección si la reparación de estos daños puede evitar el mal desarrollo (*Toder et al., 2003*).

La falta de cambios significativos en los niveles de TNF α mediante RT-PCR a E11.5, concuerda con los datos obtenidos mediante WB de MLKL-P. La vía de TNF supone activación de la necroptosis en ausencia de Caspasa 8, algo que vemos en nuestros sujetos delecionados a este tiempo. De nuevo, la ausencia de diferencias de los *KO* con respecto a los controles en los niveles de MLKL-P, así como de TNF α , concuerda con un papel fisiológico de la necroptosis es el cerebro en ausencia de Caspasa 8, sin tener un papel perjudicial en dicho tejido a diferencia de lo observado en el embrión completo.

En nuestros resultados hemos obtenido una reducción significativa de los niveles de iNOS en ausencia de Caspasa 8 a E11.5. Las enzimas de la familia óxido nítrico sintasa (NOS) son enzimas productoras de óxido nítrico (NO), una molécula de señalización celular que participa en funciones biológicas diversas incluida la vasodilatación, la neurotransmisión y la respuesta inmune. iNOS se trata de la isoforma inducible de NOS, la cual solo se expresa cuando la célula es inducida o estimulada. La inducción de iNOS puede venir de distintas vías de señalización. Una de las principales involucra la activación de NF- κ B, un objetivo principal del LPS, IL-1 β y TNF (*Cinelli et al., 2020*). Tras la activación de NF- κ B, se produce su liberación y traslocación al núcleo donde interactúa con el promotor de iNOS y desencadena la transcripción de los genes de Inos que tendrá como consecuencia la producción de NO (*Cinelli et al., 2020*). Por ello, los niveles altos de iNOS a E13.5 concuerda el aumento de expresión de IL1 β , que inducirá la señalización de iNOS.

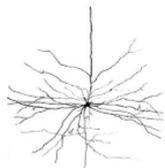
En el SNC, iNOS se expresa en células gliales y neuronas en bajas concentraciones, sin embargo, ante un daño o estimulación inflamatoria los niveles se ven aumentados por la producción por parte de la glía y de las neuronas activadas (*Cinelli et al., 2020*). Una producción moderada de NO tiene como función la defensa, y, por tanto, es esencial para la respuesta inflamatoria y el sistema inmune innato (*Cinelli et al., 2020*). Sin embargo, los niveles elevados causarían efectos tóxicos asociado a numerosas enfermedades. Por ello, la concentración es la que marcará el efecto beneficioso o perjudicial (*Cinelli et al., 2020*). La baja inducción de iNOS presente a E11.5 conllevaría una producción moderada de NO, por lo que no sería consecuencia de los daños experimentados en ausencia de Caspasa 8. A E13.5 por el contrario, observamos



DISCUSIÓN

un aumento significativo de iNOS, lo que teniendo en cuenta que conllevaría liberación de NO, estaría asociado a daño tóxico que podría contribuir en la muerte de los sujetos. Los valores aumentados de iNOS concuerdan con los valores elevados de IL1 β , implicada en su inducción.

Todos estos resultados, en conjunto, ponen de manifiesto la función esencial más allá de la apoptosis de la Caspasa 8, que conlleva la muerte de la microglía.



CAPÍTULO II.

DELECCIÓN SELECTIVA DE CASPASA 3 EN MICROGLÍA

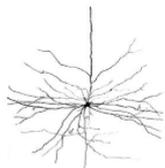
Nuestro trabajo revela que la ausencia de Caspasa 3 en la microglía de los ratones condicionales desencadena un cambio en el estado de activación de la microglía localizada en el hipocampo y, a su vez, conduce a una disminución de la neurogénesis hipocampal adulta.

Desde que Pío del Río Hortega describiera la microglía (*Del Río-Hortega, 1919*), se sabe que, además de su papel como células centinelas del sistema nervioso, están implicadas en numerosos procesos celulares, tanto en el desarrollo como en procesos fisiológicos posteriores (*García-Revilla et al., 2019; Stratoulis et al., 2019; Wright-Jin y Gutmann, 2019*). Entre todos estos procesos, se ha demostrado que la microglía juega un papel importante en la neurogénesis al liberar diferentes factores capaces de modular la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la integración de nuevas neuronas en el hipocampo adulto. Como ejemplo, los estudios que utilizan la ablación de la microglía mediante la toxina diftérica han demostrado el papel crítico de la microglía para la supervivencia de los neuroblastos (*Kreisel et al., 2019*). Sin embargo, aún no se han identificado los mecanismos moleculares que subyacen a estos efectos.

Estudios anteriores en nuestro laboratorio, han demostrado que la actividad de Caspasa 3 microglial es crítica para conducir los estados de polarización de la microglía (*Burguillos et al., 2011; Shen et al., 2016*). En conjunto todo ello nos hizo plantearnos estudiar el papel de Caspasa 3 en la neurogénesis hipocampal.

En primer lugar, tras comprobar que nuestro modelo era efectivo (*figura 32*) quisimos estudiar el efecto de la delección selectiva de Caspasa 3 en dicha microglía. La delección de Caspasa 3 en microglía supuso la reducción del número de células microgliales en el hipocampo en las dos regiones estudiadas, tanto en GD como en CA1, sin embargo, no se observaron cambios en la corteza. Por lo tanto, estos datos sugieren que Caspasa 3 tiene un papel en el mantenimiento de la microglía hipocampal.

En segundo lugar, dado el hallazgo de la reducción de microglía en ausencia de Caspasa 3 en hipocampo quisimos estudiar el estado de activación de la misma, lo que nos llevó a observar una menor activación de la microglía residual, así como una disminución de la actividad fagocítica en las tres regiones estudiadas, tanto en el hipocampo como en la corteza cerebral. Por tanto, la menor proporción de microglía activada en ausencia de Caspasa 3 junto con la alteración en la expresión de marcadores típicamente fagocíticos podría indicar que la microglía en los ratones condicionales es menos activa. En consecuencia, la microglía no podría realizar acciones típicas en una región en la que la microglía debe estar preparada para engullir las



DISCUSIÓN

neuronas apoptóticas que no se integran en el circuito y depurar las que sí lo hacen para garantizar así el correcto mantenimiento del proceso neurogénico.

En conjunto, estos resultados podrían indicar que la ausencia de Caspasa 3 altera el número de microglía total en el hipocampo y disminuye la reactividad de estas células microgliales, lo que sugiere un importante papel de Caspasa 3 en la adquisición de fenotipos microgliales reactivos especializados en la formación del hipocampo, especialmente en el área GD, donde tiene lugar la neurogénesis.

Tal y como mencionamos en la introducción, la microglía parece estar implicada en la neurogénesis, por ello, dado los hallazgos en la microglía de nuestro estudio, resultaba esencial estudiar cómo se ve afectado dicho proceso en ausencia de Caspasa 3 en microglía.

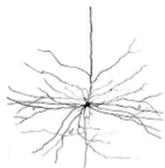
En primer lugar, encontramos un descenso significativo de las neuronas recién nacidas en el nicho del NHA que condujo a un deterioro de la memoria en los ratones Cx3cr1-CASPASA 3 KO. Esta reducción revela la disminución de la neurogénesis en nuestro modelo experimental.

Es importante destacar que la microglía asociada a nichos neurogénicos presentaba Caspasa 3 escindida, lo que plantea un posible papel de esta caspasa asesina en la regulación de la activación de la microglía en estas áreas cerebrales altamente especializadas. Por lo tanto, era imperativo estudiar la ausencia de Caspasa 3 en la microglía y su efecto en la neurogénesis.

En consecuencia, primero quisimos saber si la delección específica del gen Caspasa 3 tenía un impacto en la densidad y activación de la microglía en la región del hipocampo y considerando que la zona subgranular del hipocampo es el área donde se produce la neurogénesis adulta (*Ming y Song., 2011*).

Recientemente, se han descrito diferentes fenotipos microgliales asociados a funciones fisiológicas específicas, así como a la patología (*para una revisión, véase: (Stratoulis et al., 2019)*). Varios grupos han identificado una subpoblación de microglía que expresa altos niveles de Spp1, Gpnmb, Itgax, Cd68 y Lgals3 y que muestra una expresión preferente en la sustancia blanca y en los nichos neurogénicos (*Artegiani et al., 2017; Li et al., 2019; Safaiyan et al., 2021*). Esta subpoblación de microglía se ha denominado PAM (*Stratoulis et al., 2019*), microglía asociada al tracto axónico (ATM) (*Hammond et al., 2018*) y microglía Cd11c (*Stratoulis et al., 2019*).

Este fenotipo microglial presenta una firma molecular única con gran similitud a la DAM (*Li et al., 2019*). Curiosamente, en los pacientes de las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, así como en modelos animales de estas enfermedades, la presencia de Caspasa 3 activa en la microglía era evidente (*Burguillos et al., 2011*). De acuerdo con los estudios referidos, un marcador distinguido de esta subpoblación de microglía es Gal3 (*Li et al., 2019*), una proteína identificada por desempeñar papeles importantes en la activación de la microglía (*Lalancette-*



DISCUSIÓN

Hébert et al., 2012). De hecho, estudios transcriptómicos de alta definición han distinguido subpoblaciones microgliales con una firma única relacionada con nichos neurogénicos (**Artegiani et al., 2017; Li et al., 2019; Safaiyan et al., 2021**) siendo Gal3 un potencial marcador selectivo.

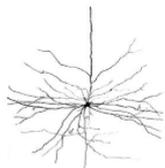
Por lo tanto, nos preguntamos si esta microglía específica Gal3⁺ también se ve reducida tras la depleción de Caspasa 3 en la microglía. Mediante inmunofluorescencia se observó que la microglía Gal3 positiva se redujo alrededor del 60%. Por lo tanto, estos datos podrían indicar que la ausencia de Caspasa 3 en la microglía cambia la proporción de microglía asociada a los nichos neurogénicos, y posiblemente impide los cambios fenotípicos necesarios para su función relacionada con los nichos neurogénicos.

Una característica distintiva de la microglía asociada a los nichos neurogénicos es su gran capacidad fagocítica (**Safaiyan et al., 2021; Butler et al., 2021**). En consonancia con este punto de vista, la mayoría de las células recién nacidas del hipocampo mueren por apoptosis, que son reconocidas y fagocitadas por la microglía (**Sierra et al., 2010**). Este proceso parece ser crítico para impulsar la neurogénesis. Estudios recientes publicados por Díaz-Aparicio et al. (**Díaz-Aparicio et al., 2020**) demostraron que este proceso fagocítico desencadena un cambio en su programa transcripcional, activando la expresión de moduladores neurogénicos. De hecho, la eliminación de componentes clave de la fagocitosis microglial produce una alteración del NHA, estableciendo así que la microglía y su aparato fagocítico son clave para la generación e integración de nuevas neuronas (**Díaz-Aparicio et al., 2020**).

Teniendo en cuenta este punto de vista, analizamos la capacidad de la microglía de ratones Caspasa 3 *KO* para fagocitar neuroblastos apoptóticos. En general, nuestro análisis demostró que la microglía que carece de Caspasa 3 presentaba una menor actividad fagocítica que explicaría la disminución de neuronas DCX⁺ recién nacidas en el modelo condicional.

Aunque queda mucho por descubrir sobre cómo la microglía modula la neurogénesis a través de su actividad, los resultados aquí presentados indican que la microglía es esencial para el proceso y que éste depende de su nivel de activación. Sin embargo, ¿cuál es el papel de la neurogénesis en el hipocampo adulto?

Numerosos estudios relacionan la neurogénesis con los procesos de aprendizaje y memoria en los que está implicado el hipocampo (**Suárez-Pereira y Carrión, 2015; Anacker y Hen, 2017; Miller y Sahay, 2019**). De hecho, se ha demostrado que el aprendizaje mejora la supervivencia de las nuevas neuronas generadas en el GD (**Gould et al., 1999**). En nuestro estudio, hemos mostrado que la microglía deficiente en Caspasa 3 es incapaz de mantener niveles normales de neurogénesis en nuestro modelo condicional de ratón. Esto implicó una deficiencia de memoria, mostrando una menor capacidad de recordar en las pruebas de



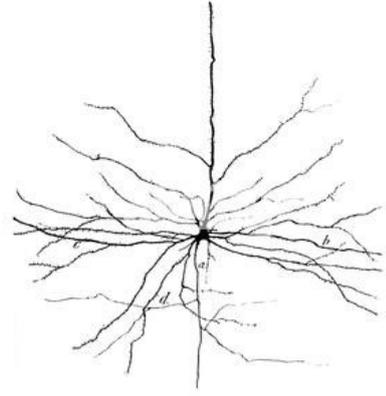
DISCUSIÓN

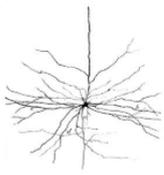
laberinto en Y y en el ORM en Cx3cr1-Caspasa 3 *KO*. Este déficit de memoria observado en nuestro modelo experimental podría confirmar que la neurogénesis es esencial para los procesos de memoria y aprendizaje.

En resumen, nuestros resultados muestran que Caspasa 3 es esencial para mantener la población específica de microglía en el hipocampo, especialmente en el nicho neurogénico. También mostramos que esta microglía tiene un fenotipo menos reactivo que el que se da en la misma región en los ratones control. Cabe destacar que la alteración de esta microglía y su deterioro en la función fagocítica se asoció con una reducción en el número de neuronas neurogénicas y, finalmente, esta alteración en la neurogénesis se asoció con una alteración en las capacidades cognitivas del ratón.

Todos estos resultados, en conjunto, ponen de manifiesto la función microglial en el proceso de neurogénesis. Por ello, es fundamental estudiar en profundidad este proceso para avanzar en el campo y definir su papel en procesos neuropatológicos crónicos como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, así como en otras patologías agudas, como el ictus.

CONCLUSIONES

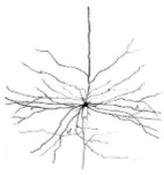




CAPÍTULO I.

LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 8 EN EL DESARROLLO EMBRIONARIO

1. La expresión ubicua y amplia de Caspasa 8 durante la embriogénesis concuerda con la menor diferenciación morfológica y deficiente conservación tisular en su ausencia.
2. La ausencia de Caspasa 8 supone la reducción de los niveles de marcadores moleculares de microglía homeostática y de la microglía asociada a enfermedad a E13.5.
3. La ausencia de cambios en los niveles de microglía homeostática a E11.5 en ausencia de Caspasa 8 con respecto a la alteración presentada a E13.5 parece indicar un defecto en la proliferación y supervivencia de la microglía y, no un problema en la migración desde el saco vitelino al SNC.
4. Los niveles reducidos de los marcadores proliferativos Ki67 y CSF1R a E13.5 en los embriones carentes de Caspasa 8 parecen apoyar la deficiencia en el mecanismo de proliferación y supervivencia celular.
5. La microglía en ausencia de Caspasa 8 presenta una menor actividad fagocítica en ambos tiempos estudiados.
6. En ausencia de Caspasa 8 se experimenta un aumento de Gal3 a E11.5, lo que podría estar relacionado más con una infiltración de macrófagos, como consecuencia de defecto de la barrera hematoencefálica, o por la secreción de dicha proteína por parte de los astrocitos que, por un aumento de microglía asociada a enfermedad ya que los marcadores específicos de este fenotipo de microglía fueron similares a los controles.
7. La delección de Caspasa 8 supone una descompensación del marcaje inflamatorio.
8. La ausencia de Caspasa 8 no supone un aumento de la vía necroptótica en el SNC a E11.5, lo que se corresponde con la función fisiológica durante el desarrollo de dicho mecanismo de muerte.
9. En ausencia de Caspasa 8 se reducen los marcadores temporales de neurogénesis. Esta reducción podría estar relacionada, no solo a la supervivencia celular sino también a la implicación esencial de microglía en la neurogénesis, por lo que su pérdida a E13.5 podría conllevar consecuencias en dicho proceso.

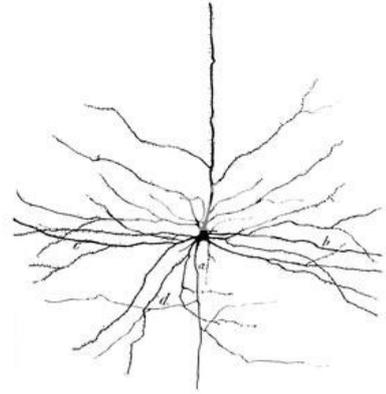


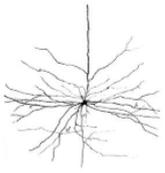
CAPÍTULO II.

LA IMPLICACIÓN DE LA CASPASA 3 EN LA NEUROGÉNESIS HIPOCAMPAL ADULTA

1. La delección selectiva de Caspasa 3 en microglía supone reducción del número de células microgliales en el hipocampo en las dos regiones estudiadas, tanto en GD como en CA1, sin observarse cambios en la corteza. Con ello, Caspasa 3 se plantea esencial en el mantenimiento de la microglía hipocampal.
2. Las células microgliales residuales experimentan una menor activación en ausencia de Caspasa 3 en las regiones estudiadas, lo que sugiere un importante papel de dicha proteasa en la adquisición de fenotipos microgliales reactivos especializados en la formación del hipocampo, especialmente en el área GD, donde tiene lugar la neurogénesis.
3. La delección selectiva de Caspasa 3 en microglía supone una reducción de la neurogénesis.
4. La microglía que carece de Caspasa 3 presenta una menor actividad fagocítica lo que podría explicar la disminución de neuronas DCX⁺ recién nacidas en el modelo condicional dado el papel esencial que tiene el proceso de fagocitosis en el proceso de eliminación de las neuronas neurogénicas apoptóticas.
5. La reducción en un 60% del marcaje de microglía Gal3⁺ en nuestro modelo, marcador específico de microglía asociada a nichos neurogénicos, parece indicar la implicación de la Caspasa 3 en el mantenimiento de la proporción de microglía asociada a nichos neurogénicos.
6. El descenso significativo de las neuronas recién nacidas en el nicho del NHA condujo a un deterioro de la memoria en los ratones carentes de Caspasa 3 en microglía.
7. El deterioro de memoria experimentado en nuestro modelo condicional podría confirmar el papel esencial de la neurogénesis en los procesos de aprendizaje y memoria.

BIBLIOGRAFÍA

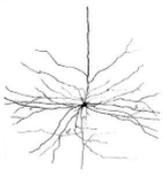




1. Aarum J, Sandberg K, Haeberlein SL, Persson MA. Migration and differentiation of neural precursor cells can be directed by microglia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(26):15983-15988.
2. Allan, L.A., Clarke, P.R., 2007. Phosphorylation of caspase-9 by CDK1/cyclin B1 protects mitotic cells against apoptosis. *Mol. Cell* 26, 301–310.
3. Alliot F, Godin I, Pessac B (1999) Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res Dev Brain Res* 117: 145–152 [pubmed] [Google Scholar]
4. Alliot, F., Godin, I. Y Pessac, B. (1999) «Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. », *Brain research. Developmental brain research*, 117(2), pp. 145-52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10567732>.
5. Alliot, F., Godin, I., Pessac, B., 1999. Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 145–152.
6. Alliot, F., Lecain, E., Grima, B., Pessac, B., 1991. Microglial progenitors with a high proliferative potential in the embryonic and adult mouse brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 1541–1545.
7. 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.
8. Altman J, Das GD. Post-natal origin of microneurons in the rat brain. *Nature*. 1965;207(5000):953-956.
9. Alvarez-Diaz S, Dillon CP, Lalaoui N, Tanzer MC, Rodriguez DA, Lin A, Lebois M, Hakem R, Josefsson EC, O'Reilly LA, Silke J, Alexander WS, Green DR, Strasser A. The Pseudokinase MLKL and the Kinase RIPK3 Have Distinct Roles in Autoimmune Disease Caused by Loss of Death-Receptor-Induced Apoptosis. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):513-526. Doi: 10.1016/j.immuni.2016.07.016. Epub 2016 Aug 11. PMID: 27523270; PMCID: PMC5040700.
10. Amaral, D.G. y Witter, M.P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*, 31:571-591.
11. Anacker, C., Hen, R., 2017. Adult hippocampal neurogenesis and cognitive flexibility - linking memory and mood. *Nat Rev Neurosci.* 18, 335-346.
12. Appel JR, Ye S, Tang F, Sun D, Zhang H, Mei L, Xiong WC (2018) Increased Microglial Activity, Impaired Adult Hippocampal Neurogenesis, and Depressive-like Behavior in Microglial VPS35-Depleted Mice. *J Neurosci* 38:5949-5968.



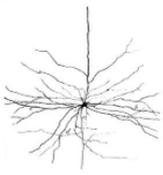
13. Arnold, T. & Betsholtz, C. The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. *Vasc Cell* 5, 4, doi:10.1186/2045-824x-5-4 (2013).
14. Arnold, T., and Betsholtz, C. Correction: the importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system, 2013. *Vasc. Cell* 5:12. Doi:10.1186/2045-824x-5-12 Ashwell, K. The distribution of microglia and cell death in the fetal rat forebrain. *Dev. Brain Res*, 1991. 58, 1–12. doi:10.1016/0165-3806(91)90231-7
15. Artegiani, B., et al., 2017. A Single-Cell RNA Sequencing Study Reveals Cellular and Molecular Dynamics of the Hippocampal Neurogenic Niche. *Cell Rep.* 21, 3271-3284.
16. Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281(5381), 1305-1308.
17. Baalman K, Marin MA, Ho TS, Godoy M, Cherian L, Robertson C, Rasband MN (2015) Axon initial segment-associated microglia. *J Neurosci* 35: 2283–2292 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
18. Bachiller, S., et al., 2018. HERC1 Ubiquitin Ligase Is Required for Normal Axonal Myelination in the Peripheral Nervous System. *Molecular neurobiology*.
19. Barón, M., and Gallego, A. The relation of the microglia with the pericytes in the cat cerebral cortex. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat*, 1972. 128, 42–57. doi:10. 1007/bf00306887
20. Belizário J, Vieira-Cordeiro L, Enns S. Necroptotic Cell Death Signaling and Execution Pathway: Lessons from Knockout Mice. *Mediators Inflamm.* 2015; 2015:128076. Doi: 10.1155/2015/128076. Epub 2015 Sep 27. PMID: 26491219; PMCID: PMC4600508.
21. Bennett FC, Bennett ML, Yaqoob F, Mulinyawe SB, Grant GA, Hayden Gephart M, Plowey ED, Barres BA (2018) A combination of ontogeny and CNS environment establishes microglial identity. *Neuron* 98: 1170–1183 e8 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
22. Bergmann O, Spalding KL, Frisén J. Adult Neurogenesis in Humans. *Cold Spring harbperspect Biol.* 2015;7:a018994-. Doi:10.1101/cshperspect.a018994
23. Biber K, Moller T, Boddeke E, Prinz M. Central nervous system myeloid cells as drug targets: current status and translational challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2016; 15:110–24.
24. Biber, K. Et al. (2007) «Neuronal “On” and “Off” signals control microglia. », *Trends in neurosciences*. Elsevier, 30(11), pp. 596-602. Doi: 10.1016/j.tins.2007.08.007.
25. Bisht K, Picard K, Vernoux N, Sharma K, Grinberg Y, Faustino J, Carson M, Vexler Z, Tremblay M. Dark microglia: A follow-up study across the lifespan. Program No.



- 295.07/N5. 2017 Neuroscience Meeting Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience, 2017. Online
26. Bisht K, Sharma KP, Lecours C, Gabriela Sánchez M, El Hajj H, Milior G, Olmos-Alonso A, Gómez-Nicola D, Luheshi G, Vallières L *et al* (2016) Dark microglia: a new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia* 64: 826–839 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
27. Blank L, Peters J, Pickvance S, Wilford J, Macdonald E. A systematic review of the factors which predict return to work for people suffering episodes of poor mental health. *J Occup Rehabil.* 2008 Mar;18(1):27-34. Doi: 10.1007/s10926-008-9121-8. Epub 2008 Jan 23. PMID: 18213510.
28. Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol.* 1973 Jul;232(2):331-56. Doi: 10.1113/jphysiol.1973.sp010273. PMID: 4727084; PMCID: PMC1350458.
29. Bogie JF, Stinissen P, Hendriks JJ. Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathol.* 2014; 128:191–213.
30. Boza-Serrano A., Reyes J. F., Rey N. L., Leffler H., Bousset L., Nilsson U., Et Al. The Role of Galectin-3 in α -sinucleínauclein-induced Microglial Activation. *Acta Neuropathol. Commun.* 2014. 2, 156. 10.1186/s40478-014-0156-0 [PMC free article] [pubmed] [crossref] [Google Scholar]
31. Boza-Serrano A., Ruiz R., Sanchez-Varo R., García-Revilla J., Yang Y., Jimenez-Ferrer I., Et Al. Galectin-3, a Novel Endogenous TREM2 Ligand, Detrimentally Regulates Inflammatory Response in Alzheimer's Disease. *Acta Neuropathol.* 2019. 138, 251–273. 10.1007/s00401-019-02013-z [PMC free article] [pubmed] [crossref] [Google Scholar]
32. Brown, G. C. Y Neher, J. J. (2014) «Microglial phagocytosis of live neurons. », *Nature reviews. Neuroscience*, 15(4), pp. 209-16. Doi: 10.1038/nrn3710.
33. Brown, J.P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C.M., Winkler, J., Aigner, L. Y Kuhn, H.G. (2003). Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *Journal of comparative neurology*, 467: 1-10.
34. Bulloch, K., Miller, M.M., Gal-Toth, J., Milner, T.A., Gottfried-Blackmore, A., Waters, E.M., et al. CD11c/EYFP transgene illuminates a discrete network of dendritic cells within the embryonic, neonatal, adult and injured mouse brain. *J. Comp. Neurol.* 2008. 508, 687–710. doi:10.1002/cne.21668
35. Burguillos M. A., Svensson M., Schulte T., Boza-Serrano A., Garcia-Quintanilla A., Kavanagh E., Et Al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand



- and Contributes to Microglial Activation. *Cell Rep.* 2015. 10, 1626–1638. 10.1016/j.celrep.2015.02.012 [pubmed] [crossref] [Google Scholar]
36. Burguillos MA, Deierborg T, Kavanagh E, Persson A, Hajji N, Garcia-Quintanilla A, et al. Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature.* 2011;472(7343):319–24. Doi: 10.1038/nature09788. - DOI - pubmed
37. Butler, C. A., et al., 2021. Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation. *J Neurochem.* 158, 621-639.
38. Butovsky O, Jedrychowski MP, Moore CS, Cialic R, Lanser AJ, Gabriely G, Koeglsperger T, Dake B, Wu PM, Doykan CE *et al* (2014) Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nat Neurosci* 17: 131–143 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
39. Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A, et al. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol Cell Neurosci.* 2006;31(1):149-160.
40. Cacci E, Ajmone-Cat MA, Anelli T, Biagioni S, Minghetti L. In vitro neuronal and glial differentiation from embryonic or adult neural precursor cells are differently affected by chronic or acute activation of microglia. *Glia.* 2008;56(4):412-425.
41. Caroline, H. Y., & Yuan, J. (2009). The Jekyll and Hyde functions of caspases. *Developmental cell*, 16(1), 21-34.
42. Carrillo-Jimenez, A., et al., 2019. TET2 Regulates the Neuroinflammatory Response in Microglia. *Cell Rep.* 29, 697-713.e8.
43. Carrodeguas-González, A., Zúñiga-Orozco, A., & Ortíz-Cruz, M. V. (2022). Ensayos in vitro para cuantificar la actividad biológica de citocinas. *Revista Tecnología En Marcha*, 35(2), Pág. 152–166. <https://doi.org/10.18845/tm.v35i2.5638>
44. Cartier, N. *Et al.* (2014) «The role of microglia in human disease: therapeutic tool or target? », *Acta Neuropathologica*, 128(3), pp. 363-380. Doi: 10.1007/s00401-014-1330-5.
45. Chan SL, Mattson MP. Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death. *J Neurosci Res.* 1999 Oct 1;58(1):167-90. PMID: 10491581.
46. Chao, C.C., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G., Peterson, P.K., 1992. Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism. *J. Immunol.* (Baltimore, Md: 1950) 149, 2736–2741.
47. Chen, G. Y. & Nuñez, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol* 10, 826-837, doi:10.1038/nri2873 (2010).



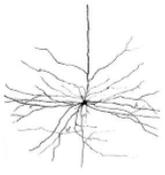
48. Chicheportiche, Y., Bourdon, P. R., Xu, H., Hsu, Y. M., Scott, H., Hession, C., ... & Browning, J. L. (1997). TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 272(51), 32401-32410.
49. Chipuk, J. E., & Green, D. R. (2008). How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends in cell biology*, 18(4), 157-164.
50. Chivu-Economescu M, Rubach M. Hematopoietic Stem Cells Therapies. *Curr Stem Cell resther*. 2016; 12:124-133. Doi:10.2174/1574888X10666151026114241
51. Christensen L.B., Woods T., Carmody A.B., Caughey B., Peterson K. *J Neuroinflammation*. 2014; 11: 70. Doi: 10.1186/1742-2094-11-70
52. Cinelli et al., 2020 Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev*. 2020 Jan;40(1):158-189. Doi: 10.1002/med.21599. Epub 2019 Jun 13. PMID: 31192483; PMCID: PMC6908786.
53. Codolo, G., Plotegher, N., Pozzobon, T., Brucale, M., Tessari, I., Bubacco, L., de Bernard, M., 2013. Triggering of inflammasome by aggregated alpha-synuclein, an inflammatory response in synucleinopathies. *Plos One* 8, e55375.
54. Colonna M, Butovsky O. Microglia function in the central nervous system during health and neurodegeneration. *Annu Rev Immunol*. 2017
55. Colton, C.A., Gilbert, D.L., 1987. Production of superoxide anions by a CNS macrophage, the microglia. *FEBS Lett*. 223, 284–288.
56. Conos SA, Chen KW, De Nardo D, Hara H, Whitehead L, Núñez G, Masters SL, Murphy JM, Schroder K, Vaux DL, Lawlor KE, Lindqvist LM, Vince JE. Active MLKL triggers the NLRP3 inflammasome in a cell-intrinsic manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 7;114(6):E961-E969. Doi: 10.1073/pnas.1613305114. Epub 2017 Jan 17. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Jul 11;114(28):E5762-E5763. PMID: 28096356; PMCID: PMC5307433.
57. Couillard-Despres S, Winner B, Karl C, Lindemann G, Schmid P, Aigner R, Laemke J, Bogdahn U, Winkler J, Bischofberger J, Aigner L. Targeted transgene expression in neuronal precursors: watching young neurons in the old brain. *Eur J Neurosci*. 2006 Sep;24(6):1535-45. Doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05039.x. PMID: 17004917.
58. Couillard-Despres S, Winner B, Schaubeck S, Aigner R, Vroemen M, Weidner N, Bogdahn U, Winkler J, Kuhn HG, Aigner L. Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis. *Eur J Neurosci*. 2005 Jan;21(1):1-14. Doi: 10.1111/j.1460-9568.2004.03813.x. PMID: 15654838.
59. Crain JM, Nikodemova M, Watters JJ (2013) Microglia express distinct M1 and M2 phenotypic markers in the postnatal and adult central nervous system in male and



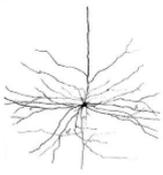
- female mice. *J Neurosci Res* 91: 1143–1151 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
60. Crowder RN, El-Deiry WS. Caspase-8 regulation of TRAIL-mediated cell death. *Exp Oncol.* 2012; 34:160–164. [pubmed] [Google Scholar]
61. Cumano, A., Godin, I., 2007. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 745–785.
62. Cunningham, C.L., Martinez-Cerdeno, V., Noctor, S.C. Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience.* 2013; 33:4216–4233. [pubmed: 23467340]
63. Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER (2002) Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* 99: 111–120 [pubmed] [Google Scholar]
64. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: not only cell death. *Cell Death Differ.* 2010;17(7):1104-1114.
65. Daoudal G, Debanne D. Long-term plasticity of intrinsic excitability: learning rules and mechanisms. *Learn Mem.* 2003 Nov-Dec;10(6):456-65. Doi: 10.1101/lm.64103. PMID: 14657257.
66. Dash, P. K., Blum, S., & Moore, A. N. (2000). Caspase activity plays an essential role in long-term memory. *Neuroreport*, 11(12), 2811-2816.
67. Davalos, D. *Et al.* (2005) «ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo», *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 8(6), pp. 752-758. Doi: 10.1038/nn1472.
68. Deczkowska, A. *Et al.* (2018) «Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. », *Cell*, 173(5), pp. 1073-1081. Doi: 10.1016/j.cell.2018.05.003.
69. Del Río-Hortega, P., El "tercer elemento" de los centros nerviosos. I. La microglia en estado normal., Vol. 8, *Bol Soc Esp Biol*, 1919, pp. 68-82.
70. Deng W., Aimone J. B., Gage F. H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 339–350. 10.1038/nrn2822 [PMC free article] [pubmed] [crossref] [Google Scholar]
71. Denoth-Lippuner A, Jessberger S. Formation and integration of new neurons in the adult hippocampus. *Nat Rev Neurosci.* 2021;22(4):223-236.



72. Diaz-Aparicio I, Paris I, Sierra-Torre V, et al. Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the Phagocytosis Secretome. *J Neurosci.* 2020;40(7):1453-1482.
73. Dillon C.P., Weinlich, D.A., Rodriguez et al. RIPK1 blocks early postnatal lethality mediated by caspase 8 and ripk3. *Cell*, 2014. Vol. 157 (5): 1189–1202.
74. Dillon CP, Oberst A, Weinlich R, Janke LJ, Kang TB, Ben-Moshe T, et al. Survival function of the FADD-CASPASE-8-cflip(L) complex. *Cell Rep.* 2012; 1:401–7.
75. Dillon CP, Tummers B, Baran K, Green DR. Developmental checkpoints guarded by regulated necrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Jun;73(11-12):2125-36. Doi: 10.1007/s00018-016-2188-z. Epub 2016 Apr 7. PMID: 27056574.
76. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999; 97:703-16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380923>
77. Dudek SM, Bear MF. Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 May 15;89(10):4363-7. Doi: 10.1073/pnas.89.10.4363. PMID: 1350090; PMCID: PMC49082.
78. Edwards RG. Human uterine endocrinology and the implantation window. *Ann N Y Acad Sci.* 1988; 541:445-54. Doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb22281.x. PMID: 3195928.
79. Ekdahl CT, Claassen JH, Bonde S, Kokaia Z, Lindvall O. Inflammation is detrimental for neurogenesis in adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Nov 11;100(23):13632-7. Doi: 10.1073/pnas.2234031100. Epub 2003 Oct 27. PMID: 14581618; PMCID: PMC263865.
80. Elinos-Báez, C.M., Maldonado. V., and Meléndez-Zajgla, J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gaceta medica de Mexico*, 2003. 139(5): 493–499.
81. Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL et al (2014) Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* 82: 380–397 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
82. Erlich B, Zhu L, Etgen AM, Dobrenis K, Pollard JW (2011) Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *Plos One* 6: e26317 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
83. Faigle R., Song H. (2013). Signaling mechanisms regulating adult neural stem cells and neurogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 2435–2448. 10.1016/j.bbagen.2012.09.002 [PMC free article] [pubmed] [crossref] [Google Scholar]



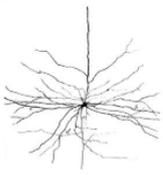
84. Fernando P, Brunette S, Megeney LA. Neural stem cell differentiation is dependent upon endogenous caspase 3 activity. *FASEB J.* 2005;19(12):1671-1673.
85. Flowers A, Bell-Temin H, Jalloh A, Stevens SM, Bickford PC (2017) Proteomic analysis of aged microglia: shifts in transcription, bioenergetics, and nutrient response. *J Neuroinflammation* 14: 96 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
86. Frade JM, Barde YA. Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron.* 1998;20(1):35-41.
87. Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, mcconnell N, Reiner O, Kahn A, mcconnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J. Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron.* 1999 Jun;23(2):247-56. Doi: 10.1016/s0896-6273(00)80777-1. PMID: 10399932.
88. fri, M. *Et al.* (2011) «Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. », *Nature neuroscience*, 14(10), pp. 1227-35. Doi:10.1038/nn.2923.
89. Fricker M, Vilalta A, Tolkovsky AM, Brown GC. Caspase inhibitors protect neurons by enabling selective necroptosis of inflamed microglia. *J Biol Chem.* 2013 Mar 29;288(13):9145-52. Doi: 10.1074/jbc.M112.427880. Epub 2013 Feb 5. PMID: 23386613; PMCID: PMC3610987.
90. Fricker, M., Oliva-Martín, M. J. Y Brown, G. C. (2012) «Primary phagocytosis of viable neurons by microglia activated with LPS or A β is dependent on calreticulin/LRP phagocytic signalling. », *Journal of neuroinflammation*, 9(1), p. 196. Doi: 10.1186/1742-2094-9-196.
91. Friedman, B. A. *Et al.* (2018) «Diverse Brain Myeloid Expression Profiles Reveal Distinct Microglial Activation States and Aspects of Alzheimer's Disease Not Evident in Mouse Models. », *Cell reports.* Elsevier, 22(3), pp. 832-847. Doi: 10.1016/j.celrep.2017.12.066.
92. Frost J.L. and Schafer D.P. Microglia: architects of the developing nervous system. *Cell Biol*, 2017. 26(8): 587-597.
93. Gadani, S. P., Cronk, J. C., Norris, G. T. & Kipnis, J. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol* 189, 4213-4219, doi:10.4049/jimmunol.1202246 (2012).
94. Galatro TF, Holtman IR, Lerario AM, Vainchtein ID, Brouwer N, Sola PR, Veras MM, Pereira TF, Leite REP, Möller T, Wes PD, Sogayar MC, Laman JD, den Dunnen W, Pasqualucci CA, Oba-Shinjo SM, Boddeke EWGM, Marie SKN, Eggen BJL. Transcriptomic analysis of purified human cortical microglia reveals age-associated changes. *Nat Neurosci.* 2017 Aug;20(8):1162-1171. Doi: 10.1038/nn.4597. Epub 2017 Jul 3. PMID: 28671693.



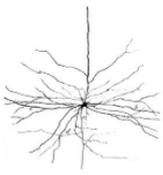
95. Galluzzi L., J. M. Bravo-San Pedro, I. Vitale et al., "Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015," *Cell Death & Differentiation*. 2015; 22 (1): 58– 73.
96. Galluzzi L., Vitale I., Abrams J. M., Alnemri E. S., Baehrecke E. H., Blagosklonny M. V., Dawson T. M., Dawson V. L., El-Deiry W. S., Fulda S., Gottlieb E., Green D. R., Hengartner M. O., Kepp O., Knight R. A., Kumar S., Lipton S. A., Lu X., Madeo F., Malorni W., Mehlen P., Nuñez G., Peter M. E., Piacentini M., Rubinsztein D. C., Shi Y., Simon H. U., Vandenabeele P., White E., Yuan J., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. (2012) Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ*. 19, 107–120 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
97. García-Domínguez, I., et al., 2021. Selective deletion of Caspase-3 gene in the dopaminergic system exhibits autistic-like behaviour. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 104, 110030.
98. García-Revilla, J., et al., 2019. Reformulating Pro-Oxidant Microglia in Neurodegeneration. *J Clin Med*. 8.
99. Gautier, E. L. *Et al.* (2012) «Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages», *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 13(11), pp. 1118-1128. Doi: 10.1038/ni.2419.
100. Gebara E, Sultan S, Kocher-Braissant J, Toni N. Adult hippocampal neurogenesis inversely correlates with microglia in conditions of voluntary running and aging. *Front Neurosci*. 2013 Aug 20; 7:145. Doi: 10.3389/fnins.2013.00145. PMID: 23970848; PMCID: PMC3747329.
101. Ginhoux, F. *Et al.* (2010) «Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. », *Science (New York, N.Y.)*, 330(6005), pp. 841-5. Doi: 10.1126/science.1194637.
102. Ginhoux, F. Y Prinz, M. (2015) «Origin of microglia: current concepts and past controversies. », *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 7(8), p. A020537. Doi: 10.1101/cshperspect.a020537.
103. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron*. 1999 Jun;23(2):257-71. Doi: 10.1016/s0896-6273(00)80778-3. PMID: 10399933.
104. Gomez Perdiguero E, Schulz C, Geissmann F. Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia. *Glia*. 2013 Jan;61(1):112-20. Doi: 10.1002/glia.22393. Epub 2012 Jul 28. PMID: 22847963.



105. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell*. 2016;167(4):897-914.
106. Gould, E., et al., 1999. Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci*. 2, 260-5.
107. Grabert K, Michoel T, Karavolos MH, Clohisey S, Baillie JK, Stevens MP, Freeman TC, Summers KM, mcoll BW (2016) Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* 19: 504–516 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
108. Green D, Oberst A, Dillon C, Weinlich R, Salvesen G. RIPK-dependent necrosis and its regulation by caspases: a mystery in five acts. *Molecular Cell*. 2011; 44:9–16. [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
109. Green, D. R., & Llambi, F. (2015). Cell death signaling. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 7(12), a006080.
110. Gruart A, Muñoz MD, Delgado-García JM. Involvement of the CA3-CA1 synapse in the acquisition of associative learning in behaving mice. *J Neurosci*. 2006 Jan 25;26(4):1077-87. Doi: 10.1523/JNEUROSCI.2834-05.2006. PMID: 16436593; PMCID: PMC6674570.
111. Hammond TR, Dufort C, Dissing-Olesen L, Giera S, Young A, Wysoker A, Walker AJ, Gergits F, Segel M, Nemesh J, Marsh SE, Saunders A, Macosko E, Ginhoux F, Chen J, Franklin RJM, Piao X, McCarroll SA, Stevens B. Single-Cell RNA Sequencing of Microglia throughout the Mouse Lifespan and in the Injured Brain Reveals Complex Cell-State Changes. *Immunity*. 2019 Jan 15;50(1):253-271.e6. doi: 10.1016/j.immuni.2018.11.004. Epub 2018 Nov 21. PMID: 30471926; PMCID: PMC6655561.
112. Han J., Harris R.A. and Zhang X. An updated assessment of microglia depletion: current concepts and future directions. *Molecular brain*, 2017. 10:25.
113. Hanisch, U.-K. Y Kettenmann, H. (2007) «Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain», *Nature Neuroscience*. Nature Publishing Group, 10(11), pp. 1387-1394. Doi: 10.1038/nn1997.
114. Harriman, W. D., Collarini, E. J., Sperinde, G. V, Strandh, M., M, M., Dutta, A., Kauvar, L. M. 2010. NIH Public Access. *Quality*, 341(2), 135–145.
115. Haynes, S. E. *Et al*. The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides. *Nat Neurosci* 9, 1512-1519, doi:10.1038/nn1805 (2006).
116. Heneka, M. T., Kummer, M. P. Y Latz, E. (2014) «Innate immune activation in neurodegenerative disease», *Nature Reviews Immunology*, 14(7), pp. 463-477. Doi: 10.1038/nri3705.



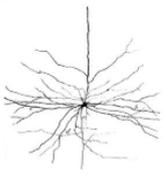
117. Hennessy, E. J., Parker, A. E. Y O'Neill, L. A. J. (2010) «Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? », *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(4), pp. 293-307. Doi: 10.1038/nrd3203.
118. Herrera, A. J. *Et al.* (2005) «Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons.», *Journal of neural transmission (Vienna, Austria: 1996)*, 112(1), pp. 111-9. Doi: 10.1007/s00702-004-0121-3.
119. Herzog MM, Kerr ZY, Marshall SW, Wikstrom EA. Epidemiology of Ankle Sprains and Chronic Ankle Instability. *J Athl Train*. 2019 Jun;54(6):603-610. Doi: 10.4085/1062-6050-447-17. Epub 2019 May 28. PMID: 31135209; PMCID: PMC6602402.
120. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang LC, Means TK, El Khoury J (2013) The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nat Neurosci* 16: 1896–1905 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
121. Homem CCF, Repic M, Knoblich JA. Proliferation control in neural stem and progenitor cells. *Nat Rev Neurosci*. 2015; 16:647-659. Doi:10.1038/nrn4021
122. Hoshiko, M., Arnoux, I., Avignone, E., Yamamoto, N. & Audinat, E. Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *J Neurosci* 32, 15106-15111, doi:10.1523/jneurosci.1167-12.2012 (2012).
123. Hui CW, St-Pierre A, El Hajj H, Remy Y, Hébert SS, Luheshi GN, Srivastava LK, Tremblay M (2018a) Prenatal immune challenge in mice leads to partly sex-dependent behavioral, microglial, and molecular abnormalities associated with Schizophrenia. *Front Mol Neurosci* 11: 13 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
124. Hyman, B. T., & Yuan, J. (2012). Apoptotic and non-apoptotic roles of caspases in neuronal physiology and pathophysiology. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(6), 395.
125. Imbriani P, Tassone A, Meringolo M, Ponterio G, Madeo G, Pisani A, Bonsi P, Martella G. Loss of Non-Apoptotic Role of Caspase-3 in the PINK1 Mouse Model of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*. 2019 Jul 11;20(14):3407. Doi: 10.3390/ijms20143407. PMID: 31336695; PMCID: PMC6678522.
126. Jessberger S, et al. Seizures induce proliferation and dispersion of doublecortin-positive hippocampal progenitor cells. *Exp Neurol*. 2005;196(2):342–351. [pubmed] [Google Scholar]
127. Jiao H, Natoli R, Valter K, Provis JM, Rutar M (2015) Spatiotemporal cadence of macrophage polarisation in a model of light-induced retinal degeneration. *PLOS ONE* 10(12): e0143952. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143952>



128. Jin X, Yamashita T. Microglia in central nervous system repair after injury. *J Biochem.* 2016; 159:491–6.
129. Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ. Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes. *Front Cell Neurosci.* 2020 Aug 6; 14:198. Doi: 10.3389/fncel.2020.00198. PMID: 32848611; PMCID: PMC7424058.
130. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 2013 Feb 21;38(2):209-23. Doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.003. PMID: 23438821.
131. Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogevev N, Jurewicz A, Waisman A, Brenner O, Haffner R, Gustafsson E, Ramakrishnan P, Lapidot T, Wallach D. Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol.* 2004 Sep 1;173(5):2976-84. Doi: 10.4049/jimmunol.173.5.2976. PMID: 15322156.
132. Kang TB, Oh GS, Scandella E, Bolinger B, Ludewig B, Kovalenko A, Wallach D (2008) Mutation of a self-processing site in caspase-8 compromises its apoptotic but not its nonapoptotic functions in bacterial artificial chromosome-transgenic mice. *J Immunol* 181(4):2522–2532
133. Kavanagh E, Burguillos MA, Carrillo-Jimenez A, Oliva-Martin MJ, Santiago M, Rodhe J, Joseph B, Venero JL. Deletion of caspase-8 in mouse myeloid cells blocks microglia pro-inflammatory activation and confers protection in MPTP neurodegeneration model. *Aging (Albany NY).* 2015 Sep;7(9):673-89. Doi: 10.18632/aging.100805. PMID: 26405176; PMCID: PMC4600625.
134. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, David E, Baruch K, Lara-Astaiso D, Toth B *et al* (2017) A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease. *Cell* 169: 1276–1290 e17 [pubmed] [Google Scholar]
135. Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron* 77: 10 – 18.
136. Kidd VJ. Proteolytic activities mediate apoptosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:533-73.
137. Kierdorf K and Prinz M. Factors regulating microglia activation. *Cell Neuro*, 2013. Vol. 7. 273-280.
138. Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Holscher C, Muller DN, Luckow B, Broucker T, Debowski K, Fritz G, Opendakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F *et al* (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nat Neurosci* 16: 273 – 280



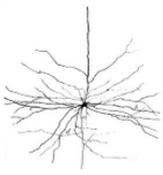
139. Kojima Y, Tam OH, Tam PP. Timing of developmental events in the early mouse embryo. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Oct;34:65-75. Doi: 10.1016/j.semcd.2014.06.010. Epub 2014 Jun 17. PMID: 24954643.
140. Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, Beckers L, O'Loughlin E, Xu Y, Fanek Z *et al* (2017) The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity* 47: 566–581 e9 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
141. Kreisel T, Wolf B, Keshet E, Licht T. Unique role for dentate gyrus microglia in neuroblast survival and in VEGF-induced activation. *Glia.* 2019 Apr;67(4):594-618. Doi: 10.1002/glia.23505. Epub 2018 Nov 19. PMID: 30453385.
142. Kronenberg, G. Et al. Subpopulations of proliferating cells of the adult hippocampus respond differently to physiologic neurogenic stimuli. *J. Comp. Neurol.* 467, 455–463 (2003).
143. Kuida K., Zheng T.S., Na S., Kuan C., Yang D., Karasuyama H., Rakic P., Flavell R.A. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature.* 1996; 384:368–372. Doi: 10.1038/384368a0. [pubmed] [crossref] [Google Scholar]
144. Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell death and differentiation, 14*(1), 32.
145. 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*(3), 283-290.
146. Lalancette-Hébert M., Swarup V., Beaulieu J.M., Bohacek I., Abdelhamid E., Weng Y.C., Sato S., Kriz J. Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury. *Jneurosci*, 2012. Vol 32 (30): 10383-10395.
147. Lamkanfi M, Declercq W, Kalai M, Saelens X, Vandenabeele P. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ.* 2002;9(4):358-361.
148. Lavrik, I., Golks, A., & Krammer, P. H. (2005). Death receptor signaling. *Journal of cell science, 118*(2), 265-267.
149. Lazarini F, Gabellec M-M, Moigneu C, de Chaumont F, Olivo-Marin J-C, Lledo P-M. Adult neurogenesis Restores Dopaminergic Neuronal Loss in the Olfactory Bulb. *J Neurosci.* 2014;34:14430-14442. Doi:10.1523/JNEUROSCI.5366-13.2014



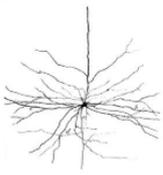
150. Lee, C. Y. D. Et al. (2018) «Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models», *Neuron. Cell Press*, 97(5), p. 1032-1048.e5. Doi: 10.1016/J.NEURON.2018.02.002.
151. Lee, C. Y. D. Et al. (2018) «Elevated TREM2 Gene Dosage Reprograms Microglia Responsivity and Ameliorates Pathological Phenotypes in Alzheimer's Disease Models», *Neuron. Cell Press*, 97(5), p. 1032-1048.e5. Doi: 10.1016/J.NEURON.2018.02.002.
152. Lehnardt S, Wennekamp J, Freyer D, Liedtke C, Krueger C, Nitsch R, Bechmann I, Weber JR, Henneke P. TLR2 and caspase-8 are essential for group B Streptococcus-induced apoptosis in microglia. *J Immunol.* 2007 Nov 1;179(9):6134-43. Doi: 10.4049/jimmunol.179.9.6134. PMID: 17947688.
153. Leseva M, Knowles BB, Messerschmidt DM, Solter D. Erase-Maintain-Establish: natural reprogramming of the Mammalian Epigenome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2015; 80:155-63. Doi:10.1101/sqb.2015.80.027441
154. Leyns, C. E. G. Et al. (2017) «TREM2 deficiency attenuates neuroinflammation and protects against neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. », *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(43), pp. 11524-11529. Doi: 10.1073/pnas.1710311114.
155. Li Q, Cheng Z, Zhou L, Darmanis S, Neff NF, Okamoto J, Gulati G, Bennett ML, Sun LO, Clarke LE, Marschallinger J, Yu G, Quake SR, Wyss-Coray T, Barres BA (2019) Developmental Heterogeneity of Microglia and Brain Myeloid Cells Revealed by Deep Single-Cell RNA Sequencing. *Neuron* 101:207-223.e210.
156. Li Z, Jo J, Jia JM, et al. Caspase-3 activation via mitochondria is required for long-term depression and AMPA receptor internalization. *Cell.* 2010;141(5):859-871.
157. Li, H., Zhu, H., Xu, C. J., & Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell*, 94(4), 491-501.
158. Li, J., & Yuan, J. (2008). Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27(48), 6194.
159. Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., & Wang, X. (1997). Cytochrome c and datp-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4), 479-489.
160. Lindeberg, J., Usoskin, D., Bengtsson, H., Gustafsson, A., Kylberg, A., Söderström, S., & Ebendal, T. (2004). Transgenic expression of Cre recombinase from the tyrosine hydroxylase locus. *Genesis*, 40(2), 67-73.
161. Los, M., Wesselborg, S., & Schulze-osthoff, K. (1997). The Role of Caspases in Development, Immunity, and Apoptotic Signal Transduction: Lessons from Knockout Mice, 1, 629-639.



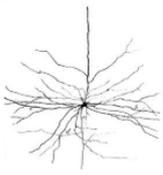
162. Luo, C., Koyama, R. & Ikegaya, Y. Microglia engulf viable newborn cells in the epileptic dentate gyrus. *Glia* 64, 1508-1517, doi:10.1002/glia.23018 (2016).
163. Lyssiotis CA, Lairson LL, Boitano AE, Wurdak H, Zhu S, Schultz PG. Chemical Control of Stem Cell Fate and Developmental Potential. *Angew Chemie Int Ed.* 2011;50:200-242. doi:10.1002/anie.201004284
164. Mace, P. D., & Riedl, S. J. (2010). Molecular cell death platforms and assemblies. *Current opinion in cell biology*, 22(6), 828-836.
165. Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M. Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*. 2004;41(4):535-547.
166. Martin SJ, Grimwood PD, Morris RG. Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. *Annu Rev Neurosci.* 2000; 23:649-711. Doi: 10.1146/annurev.neuro.23.1.649. PMID: 10845078.
167. Martinez FO, Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 6: 13 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
168. Martinon, F., & Tschopp, J. (2007). Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell death and differentiation*, 14(1), 10.
169. Masuda T, Prinz M. Microglia: a unique versatile cell in the central nervous system. *ACS Chem Neurosci.* 2016; 7:428–34.
170. Masuda T, Sankowski R, Staszewski O, Böttcher C, Amann L, Scheiwe C, Nessler S, Kunz P, van Loo G, Coenen VA *et al* (2019) Spatial and temporal heterogeneity of mouse and human microglia at single-cell resolution. *Nature* 566: 388–392 [pubmed] [Google Scholar]
171. Matcovitch-Natan, O. *Et al.* (2016) «Microglia development follows a stepwise program to regulate brain homeostasis. », *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 353(6301), p. Aad8670. Doi: 10.1126/science.aad8670.
172. Mathys, H. *Et al.* (2017) «Temporal Tracking of Microglia Activation in Neurodegeneration at Single-cell Resolution. », *Cell reports*. NIH Public Access, 21(2), pp. 366-380. Doi: 10.1016/j.celrep.2017.09.039.
173. Mischeau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 114(2), 181-190.
174. Miller SM, Sahay A. Functions of adult-born neurons in hippocampal memory interference and indexing. *Nat Neurosci.* 2019 Oct;22(10):1565-1575. Doi: 10.1038/s41593-019-0484-2. Epub 2019 Sep 2. PMID: 31477897; PMCID: PMC7397477.



175. Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011 May 26;70(4):687-702. doi: 10.1016/j.neuron.2011.05.001. PMID: 21609825; PMCID: PMC3106107.
176. Mira H, Morante J. Neurogenesis From Embryo to Adult - Lessons From Flies and Mice. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Jun 30; 8:533. Doi: 10.3389/fcell.2020.00533. Erratum in: *Front Cell Dev Biol*. 2020 Aug 13; 8:686. PMID: 32695783; PMCID: PMC7339912.
177. Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1760-5. Doi: 10.1126/science.1088417. Epub 2003 Nov 13. PMID: 14615545.
178. Monterde JC and Gil F. *Embriología veterinaria: Un enfoque dinámico del desarrollo animal* José García Monterde, Francisco Gil Cano N^o (2012). Ed. Intermédica.
179. Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006; 441:1068- 1074. Doi:10.1038/nature04956
180. Mosher KI, Andres RH, Fukuhara T, et al. Neural progenitor cells regulate microglia functions and activity. *Nat Neurosci*. 2012;15(11):1485-1487.
181. Moss J, Gebara E, Bushong EA, et al. Fine processes of Nestin-GFP-positive radial glia-like stem cells in the adult dentate gyrus ensheath local synapses and vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(18): E2536-E2545.
182. Mosser CA, Baptista S, Arnoux I, Audinat E. Microglia in CNS development: Shaping the brain for the future. *Prog Neurobiol*. 2017;149-150:1-20.
183. Musaelyan K, Egeland M, Fernandes C, Pariante CM, Zunszain PA, Thuret S (2014) Modulation of adult hippocampal neurogenesis by early-life environmental challenges triggering immune activation. *Neural Plast* 2014:194396.
184. Nagatsu, T. Y Sawada, M. «Inflammatory process in Parkinson's disease: role for cytokines. », *Current pharmaceutical design*. 2005; 11(8), pp. 999-1016. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777250>.
185. Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. *Am J Pathol*. 2000 Mar;156(3):899-909. Doi: 10.1016/S0002-9440(10)64959-0. PMID: 10702407; PMCID: PMC1876842.
186. Navarro-Quiroz E, Navarro-Quiroz R, España-Puccini P, Ahmad M, Díaz-Pérez A, Villareal JL, Vásquez L, Torres A. Neurogenesis in adult brain. *Salud Uninorte. Barranquilla (Col.)* 2018; 34 (1): 144-159. <https://doi.org/10.14482/sun.34.1.9992>



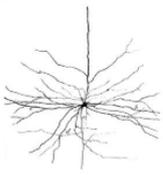
187. Neher J. J., Brown G. C. (2007) Neurodegeneration in models of Gram-positive bacterial infections of the central nervous system. *Biochem. Soc. Trans.* 35, 1166–1167 [pubmed] [Google Scholar]
188. Neumann J, Bras J, Deas E, O'Sullivan SS, Parkkinen L, Lachmann RH, Li A, Holton J, Guerreiro R, Paudel R, Segarane B, Singleton A, Lees A, Hardy J, Houlden H, Revesz T, Wood NW. Glucocerebrosidase mutations in clinical and pathologically proven Parkinson's disease. *Brain.* 2009 Jul;132(Pt 7):1783-94. Doi: 10.1093/brain/awp044. Epub 2009 Mar 13. PMID: 19286695; PMCID: PMC2702833.
189. Niklison-Chirou MV, Agostini M, Amelio I, Melino G. Regulation of Adult Neurogenesis in Mammalian Brain. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 9;21(14):4869. Doi: 10.3390/ijms21144869. PMID: 32660154; PMCID: PMC7402357.
190. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. Y Helmchen, F. (2005) «Resting microglial cells are highly Dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. », *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 308(5726), pp. 1314-8. Doi: 10.1126/science.1110647.
191. Nomura K, Vilalta A, Allendorf DH, Hornik TC, Brown GC. Activated Microglia Desialylate and Phagocytose Cells via Neuraminidase, Galectin-3, and Mer Tyrosine Kinase. *J Immunol.* 2017 Jun 15;198(12):4792-4801. doi: 10.4049/jimmunol.1502532. Epub 2017 May 12. PMID: 28500071; PMCID: PMC5458330.
192. Norbury, C. J., & Hickson, I. D. (2001). Cellular responses to DNA damage. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 41(1), 367-401.
193. Obernier K, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development.* 2019 Feb 18;146(4): dev156059.
194. Oberst A., C. P. Dillon, R. Weinlich et al., “Catalytic activity of the caspase-8–FLIPL complex inhibits RIPK3-dependent necrosis,” *Nature.* 2011; vol. 471(7338): 363–367.
195. Oberst A., Green D.R., It cuts both ways: reconciling the dual roles of caspase 8 in cell death and survival. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Oct 21;12(11):757-63.
196. Olah, M. *Et al.* (2018) «A transcriptomic atlas of aged human microglia.», *Nature communications*,
197. Oosterhof N, Chang IJ, Karimiani EG, Kuil LE, Jensen DM, Daza R, Young E, Astle L, van der Linde HC, Shivaram GM et al (2019) Homozygous mutations in CSF1R cause a pediatric-onset leukoencephalopathy and can result in congenital absence of microglia. *Am J Hum Genet* 104: 936–947 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]



198. Orozco S, Oberst A. RIPK3 in cell death and inflammation: the good, the bad, and the ugly. *Immunol Rev.* 2017 May;277(1):102-112. Doi: 10.1111/imr.12536. PMID: 28462521; PMCID: PMC5419046.
199. Pallarés García, MP (2008). Valoración no invasiva de la gestación y la embriogénesis en ratón mediante técnicas de imagen ultrasonográfica [Tesis de Doctorado, Universidad Complutense de Madrid]Repositorio Institucional de la UCM
200. Paolicelli, R. C. *Et al.* Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458, doi:10.1126/science.1202529 (2011).
201. Parkhurst, C.N. *Et al.* Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596-1609, doi:10.1016/j.cell.2013.11.030 (2013).
202. Perdiguero EG, Klapproth K, Schulz C, Busch K, de Bruijn M, Rodewald HR, Geissmann F (2015) The origin of tissue-resident macrophages: when an erythro-myeloid progenitor is an erythro-myeloid progenitor. *Immunity* 43: 1023–1024 [pubmed] [Google Scholar]
203. Peter, M. E., & Krammer, P. H. (1998). Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current opinion in immunology*, 10(5), 545-551.
204. Pilz, G. A., Bottes, S., Betizeau, M., Jörg, D. J., Carta, S., Simons, B. D., Helmchen, F., & Jessberger, S. Live imaging of neurogenesis in the adult mouse hippocampus. *Science*. 2018;359(6376):658-662.
205. Poliani, P. L. *Et al.* (2015) «TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination», *The Journal of Clinical Investigation*. American Society for Clinical Investigation, 125(5), pp. 2161-2170. Doi: 10.1172/JCI77983.
206. Pont-Lezica L, et al. Microglia shape corpus callosum axon tract fasciculation: functional impact of prenatal inflammation. *Eur J Neurosci.* 2014; 39:1551–1557. [pubmed: 24593277]
207. Prinz, M. Y Priller, J. (2014) «Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. », *Nature reviews. Neuroscience*, 15(5), pp. 300-12. Doi: 10.1038/nrn3722.
208. Qin, H., Srinivasula, S. M., Wu, G., Fernandes-Alnemri, T., Alnemri, E. S., & Shi, Y. (1999). Structural basis of procaspase-9 recruitment by the apoptotic protease-activating factor 1. *Nature*, 399(6736), 549.
209. Ramírez MLG, Salvesen GS. A primer on caspase mechanisms. *Semin Cell Dev Biol.* 2018; 82:79-85.
210. Ransohoff RM (2016) A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nat Neurosci* 19: 987–991 [pubmed] [Google Scholar]



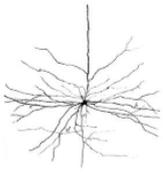
211. Ransohoff, R. M. Y Perry, V. H. (2009) «Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. », *Annual review of immunology*, 27(1), pp. 119-45. Doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132528.
212. Raoul, C., Henderson, C. E., & Pettmann, B. (1999). Programmed cell death of embryonic motoneurons triggered through the Fas death receptor. *The Journal of cell biology*, 147(5), 1049-1062.
213. Rébé, C., Cathelin, S., Launay, S., Filomenko, R., Prévotat, L., L'Ollivier, C., ... & Fontenay, M. (2007). Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kb in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood*, 109(4), 1442-1450.
214. Redell JB, Dash PK. Traumatic brain injury stimulates hippocampal catechol-O-methyl transferase expression in microglia. *Neurosci Lett*. 2007 Feb 8;413(1):36-41. Doi: 10.1016/j.neulet.2006.11.060. Epub 2006 Dec 15. PMID: 17240060; PMCID: PMC1857315.
215. Reemst K, Noctor SC, Lucassen PJ, Hol EM. The indispensable roles of microglia and astrocytes during brain development. *Front Hum Neurosci*. 2016; 10:566.
216. Rehker J, Rodhe J, Nesbitt RR, Boyle EA, Martin BK, Lord J, Karaca I, Naj A, Jessen F, Helisalmi S, Soininen H, Hiltunen M, Ramirez A, Scherer M, Farrer LA, Haines JL, Pericak-Vance MA, Raskind WH, Cruchaga C, Schellenberg GD, Joseph B, Brkanac Z. Caspase-8, association with Alzheimer's Disease and functional analysis of rare variants. *Plos One*. 2017 Oct 6;12(10): e0185777. Doi: 10.1371/journal.pone.0185777. PMID: 28985224; PMCID: PMC5630132.
217. Rezaie P, Male D. Mesoglia & microglia--a historical review of the concept of mononuclear phagocytes within the central nervous system. *J Hist Neurosci*. 2002 Dec;11(4):325-74. Doi: 10.1076/jhin.11.4.325.8531. PMID: 12557654.
218. Ribeiro Xavier AL, Kress BT, Goldman SA, Lacerda de Menezes JR, Nedergaard M (2015) A distinct population of microglia supports adult neurogenesis in the subventricular zone. *J Neurosci* 35: 11848–11861 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
219. Rigato, C. *Et al.* (2011) «Pattern of invasion of the embryonic mouse spinal cord by microglial cells at the time of the onset of functional neuronal networks. », *Glia*, 59(4), pp. 675-95. Doi: 10.1002/glia.21140.
220. Río-Hortega P (1919b) El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos). *Bol Soc Esp Biol* VIII: 69–109 [Google Scholar]



221. Río-Hortega, P. El “tercer elemento” de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal. II. Intervención de la microglía en los procesos patológicos (células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos). *Bol. Soc. Esp. Biol.* VIII, 69–109., 1919c.
222. Robertson GS, Crocker SJ, Nicholson DW, Schulz JB. Neuroprotection by the inhibition of apoptosis. *Brain Pathol.* 2000 Apr;10(2):283-92. Doi: 10.1111/j.1750-3639.2000.tb00262.x. PMID: 10764048; PMCID: PMC8098500.
223. Rojas, M., Salmen, S., & Berrueta, L. (2009). Muerte celular programada: Activación y mecanismos de regulación. *Revista Médica de La Extensión Portuguesa*, 4(3), 92–106.
224. Roman FS, Truchet B, Marchetti E, Chaillan FA, Soumireu-Mourat B. Correlations between electrophysiological observations of synaptic plasticity modifications and behavioral performance in mammals. *Prog Neurobiol.* 1999 May;58(1):61-87. Doi: 10.1016/s0301-0082(98)00076-8. PMID: 10321797.
225. Rubio-Moscardo, F., Blesa, D., Mestre, C., Siebert, R., Balasas, T., Benito, A., ... & Karran, E. L. (2005). Characterization of 8p21. 3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106(9), 3214-3222.
226. Rushing G, Ihrle RA. Neural stem cell heterogeneity through time and space in the ventricular-subventricular zone. *Front Biol.* 2016; 11:261-284. Doi:10.1007/s11515-016-1407-1
227. Safaiyan, S., et al., 2021. White matter aging drives microglial diversity. *Neuron*. 109, 1100-1117.e10.
228. Sahay A., Scobie K. N., Hill A. S., O'Carroll C. M., Kheirbek M. A., Burghardt N. S., et al.. (2011). Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to improve pattern separation. *Nature* 472, 466–470. 10.1038/nature09817 [PMC free article] [pubmed] [crossref] [Google Scholar]
229. Salvesen, G. S., & Walsh, C. M. (2014). Functions of caspase 8: The identified and the mysterious. *Seminars in Immunology*, 26(3), 246–252.
230. Schafer DP, Lehrman EK, Kautzman AG, Koyama R, Mardinly AR, Yamasaki R, Ransohoff RM, Greenberg ME, Barres BA, Stevens B (2012) Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. *Neuron* 74: 691–705 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
231. Schafer DP, Stevens B. Microglia Function in Central Nervous System Development and Plasticity. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2015; 7
232. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010 Mar 19;140(6):821-32. Doi: 10.1016/j.cell.2010.01.040. PMID: 20303873.



233. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW, Frampton J, Liu KJ, Geissmann F (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86 – 90
234. Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L, Szabo-Rogers H, Cagnard N, Kierdorf K, Prinz M, Wu B, Jacobsen SE, Pollard JW *et al* (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science* 336: 86–90 [pubmed] [Google Scholar]
235. Schulz, C. *Et al.* (2012) «A Lineage of Myeloid Cells Independent of Myb and Hematopoietic Stem Cells», *Science*, 336(6077), pp. 86-90. Doi: 10.1126/science.1219179.
236. Shalini, S., Dorstyn, L., Dawar, S., & Kumar, S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell death and differentiation*, 22(4), 526.
237. Sharon G, Sampson TR, Geschwind DH, Mazmanian SK. The Central Nervous System and the Gut Microbiome. *Cell*. 2016 Nov 3;167(4):915-932. doi: 10.1016/j.cell.2016.10.027. PMID: 27814521; PMCID: PMC5127403.
238. Shen X, Burguillos MA, Joseph B. Guilt by association, caspase-3 regulates microglia polarization. *Cell Cycle*. 2017 Feb 16;16(4):306-307. Doi: 10.1080/15384101.2016.1254979. Epub 2016 Nov 10. PMID: 27830972; PMCID: PMC5324741.
239. Shen X, Burguillos MA, Osman AM, Frijhoff J, Carrillo-Jiménez A, Kanatani S, Augsten M, Saidi D, Rodhe J, Kavanagh E, Rongvaux A, Rraklli V, Nyman U, Holmberg J, Östman A, Flavell RA, Barragan A, Venero JL, Blomgren K, Joseph B. Glioma-induced inhibition of caspase-3 in microglia promotes a tumor-supportive phenotype. *Nat Immunol*. 2016 Nov;17(11):1282-1290. Doi: 10.1038/ni.3545. Epub 2016 Sep 12. PMID: 27618552.
240. Shen X, Venero JL, Joseph B, Burguillos MA. Caspases orchestrate microglia instrumental functions. *Prog Neurobiol*. 2018 Dec; 171:50-71. Doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.09.007. Epub 2018 Oct 2. PMID: 30290215.
241. Shi SH, Jan LY, Jan YN. Hippocampal neuronal polarity specified by spatially localized mpar3/mpar6 and PI 3-kinase activity. *Cell*. 2003 Jan 10;112(1):63-75. Doi: 10.1016/s0092-8674(02)01249-7. PMID: 12526794.
242. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia enhance neurogenesis and oligodendrogenesis in the early postnatal subventricular zone. *J Neurosci*. 2014;34(6):2231-2243.
243. Sierra A, de Castro F, Del Rio-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H. The "Big-Bang" for modern glial biology: translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*. 2016; 64:1801–40.



244. Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, et al. Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*. 2010;7(4):483-495.
245. Sierra A, Tremblay MÈ, Wake H. Never-resting microglia: physiological roles in the healthy brain and pathological implications. *Front Cell Neurosci*. 2014 Aug 15; 8:240. Doi: 10.3389/fncel.2014.00240. PMID: 25177273; PMCID: PMC4133768.
246. Slee, E. A., Harte, M. T., Kluck, R. M., Wolf, B. B., Casiano, C. A., Newmeyer, D. D., ... & Green, D. R. (1999). Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and-10 in a caspase-9-dependent manner. *The Journal of cell biology*, 144(2), 281-292.
247. Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull*. 2012;28(1):14-24.
248. Sobhani A, Khanlarkhani N, Baazm M, Mohammadzadeh F, najafia, Mehdinejadi S, etal. Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta Med Iran*. 2017; 55:6-23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28188938>
249. 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.
250. Squarzoni P, et al. Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain. *Cell Rep*. 2014; 8:1271-1279.
251. Steiner, B., Klempin, F., Wang, L., Kott, M., Kettenmann, H. Y Kempermann, G. (2006). Type-2 cells as link between glial and neuronal lineage in adult hippocampal neurogenesis. *Glia*, 54:805-14.
252. Stepanichev, M. Y., Kudryashova, I. V., Yakovlev, A. A., Onufriev, M. V., Khaspekov, L. G., Lyzhin, A. A., ... & Gulyaeva, N. V. (2005). Central administration of a caspase inhibitor impairs shuttle-box performance in rats. *Neuroscience*, 136(2), 579-591.
253. Stevens B, Allen NJ, Vazquez LE, Howell GR, Christopherson KS, Nouri N, Micheva KD, Mehalow AK, Huberman AD, Stafford B *et al* (2007) The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell* 131: 1164-1178 [pubmed] [Google Scholar]
254. Stratoulas V, Venero JL, Tremblay MÈ, Joseph B. Microglial subtypes: diversity within the microglial community. *EMBO J*. 2019 Sep 2;38(17): e101997. Doi: 10.15252/embj.2019101997. Epub 2019 Aug 2. PMID: 31373067; PMCID: PMC6717890.
255. Suárez-Pereira I, Carrión ÁM. Updating stored memory requires adult hippocampal neurogenesis. *Sci Rep*. 2015 Sep 11;5:13993. doi: 10.1038/srep13993. PMID: 26358557; PMCID: PMC4566137.

256. Suliman, A., Lam, A., Datta, R., & Srivastava, R. K. (2001). Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and-independent pathways. *Oncogene*, 20(17), 2122.
257. Sun GJ, Zhou Y, Stadel RP, et al. Tangential migration of neuronal precursors of glutamatergic neurons in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(30):9484-9489.
258. Sundblad V., Croci D.O., Rabinovich G.A. Regulated expression of galectin-3, a multifunctional glycan-binding protein, in haematopoietic and non-haematopoietic tissues. *Histol Histopathol*, 2011. 26, 247-265.
259. Swinnen, N., Smolders, S., Avila, A., Notelaers, K., Paesen, R., Ameloot, M., et al. Complex invasión pattern of the cerebral cortex by microglial cells during development of the mouse embryo. *Glia*, 2013. 61, 150–163.doi:10.1002/glia.22421
260. Tam PP, Tan SS. The somitogenetic potential of cells in the primitive streak and the tail bud of the organogenesis-stage mouse embryo. *Development*. 1992 Jul;115(3):703-15. Doi: 10.1242/dev.115.3.703. PMID: 1425350.
261. Tashiro A, Sandler VM, Toni N, Zhao C, Gage FH. NMDA-receptor-mediated, cell-specific integration of new neurons in adult dentate gyrus. *Nature*. 2006;442(7105):929-933.
262. Tay TL, Savage JC, Hui CW, Bisht K, Tremblay M (2017c) Microglia across the lifespan: from origin to function in brain development, plasticity and cognition. *J Physiol* 595: 1929–1945 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
263. Toder V, Fein A, Carp H, Torchinsky A. TNF-alpha in pregnancy loss and embryo maldevelopment: a mediator of detrimental stimuli or a protector of the fetoplacental unit? *J Assist Reprod Genet*. 2003 Feb;20(2):73-81. Doi: 10.1023/a:1021740108284. PMID: 12688591; PMCID: PMC3455795.
264. Tremblay, M., Lecours, C., Samson, L., Sánchez-Zafra, V. & Sierra, A. From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia. *Front Neuroanat* 9, 45, doi:10.3389/fnana.2015.00045 (2015).
265. Tremblay, M.-È., Lowery, R. L. Y Majewska, A. K. (2010) «Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. », *plos biology*. Editado por M. Dalva, 8(11), p. E1000527. Doi: 10.1371/journal.pbio.1000527.
266. Turano A., Lawrence J.H., and Schwarz J.M. Activation of neonatal microglia can be influenced by other neural cell. *Neuroscience letters*, 2017. 657:32-37.
267. Ueno, M., and Yamashita, T. Bidirectional tuning of microglia in the developing brain: from neurogenesis to neural circuit formation. *Curr. Opin. Neurobiol*, 2014. 27, 8–15. Doi: 10.1016/j.conb.2014.02.004

268. Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA. Role for glia in synaptogenesis. *Glia*. 2004;47(3):209-216.
269. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci*. 2014 Nov 27;8:396. Doi: 10.3389/fncel.2014.00396. Erratum in: *Front Cell Neurosci*. 2015; 9:160. PMID: 25505873; PMCID: PMC4245909.
270. Van den Berge SA, van Strien ME, Hol EM. Resident adult neural stem cells in Parkinson's disease-The brain's own repair system? *Eur J Pharmacol*. 2013;719:117-127.doi:10.1016/j.ejphar.2013.04.058
271. Van Opdenbosch N, Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*. 2019;50(6):1352-1364.
272. Vandenabeele P. And G. Melino, "The flick of a switch: Which death program to choose?" *Cell Death and Differentiation*. 2012; vol. 19(7): 1093–1095.
273. Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. *Cell Death Differ*. 2012; 19:75–86. [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
274. Varfolomeev EE, Schuchmann M, Luria V, Chiannikulchai N, Beckmann JS, Mett IL, Rebrikov D, Brodianski VM, Kemper OC, Kollet O, Lapidot T, Soffer D, Sobe T, Avraham KB, Goncharov T, Holtmann H, Lonai P, Wallach D. Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*. 1998 Aug;9(2):267-76. Doi: 10.1016/s1074-7613(00)80609-3. PMID: 9729047.
275. Vasudevan, A., and Bhide, P.G. Angiogenesis in the embryonic CNS: a new twist on an old tale. *Cell Adh.Migr*, 2008. 2, 167–169.
276. Venero, J. L., Burguillos, M. A., & Joseph, B. (2013). Caspases playing in the field of neuroinflammation: old and new players. *Developmental neuroscience*, 35(2-3), 88-101.
277. 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.
278. Vicidomini C, Guo N, Sahay A (2020) Communication, Cross Talk, and Signal Integration in the Adult Hippocampal Neurogenic Niche. *Neuron* 105:220-235.
279. Virchow R. (1858). *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf Physiologische und Pathologische Gewebelehre*. Berlín: Hirschwald. [Google académico]
280. Wake, H., Moorhouse, A. J., Jinno, S., Kohsaka, S. & Nabekura, J. Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29, 3974-3980, doi:10.1523/jneurosci.4363-08.2009 (2009).

281. Walton NM, Sutter BM, Laywell ED, Levkoff LH, Kearns SM, Marshall GP, Scheffler B, Steindler DA (2006) Microglia instruct subventricular zone neurogenesis. *Glia* 54:815-825.
282. 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.
283. Wang, Y. *Et al.* (2015) «TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model. », *Cell*. Elsevier, 160(6), pp. 1061-71. Doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
284. Westphal D, Sytnyk V, Schachner M, Leshchyns'ka I (2010) Clustering of the neural cell adhesion molecule (NCAM) at the neuronal cell surface induces caspase-8- and -3-dependent changes of the spectrin meshwork required for NCAM-mediated neurite outgrowth. *J Biol Chem* 285:42046-42057.
285. 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(10), 1234.
286. Wlodarczyk A., Holtman I.R., Krueger M., Yogev N., et al. A novel microglial subset plays a key role in myelinogenesis in developing brain. *The EMBO Journal*, 2017. Vol 36: 3292-3308.
287. Wolf S.A, Boddeke HW, Kettenmann H. Microglia in physiology and disease. *Annu Rev Physiol.* 2016; 7:26.
288. *Wright-Jin, E. C., Gutmann, D. H., 2019. Microglia as Dynamic Cellular Mediators of Brain Function. Trends Mol Med. 25, 967-979.*
289. Xavier AL, Lima FR, Nedergaard M, Menezes JR (2015) Ontogeny of CX3CR151-EGFP expressing cells unveil microglia as an integral component of the postnatal subventricular zone. *Front Cell Neurosci* 9: 37 [PMC free article] [pubmed] [Google Scholar]
290. Yamada, A., Arakaki, R., Saito, M., Kudo, Y., & Ishimaru, N. (2017). Dual role of Fas/fasl-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Frontiers in immunology*, 8, 403.
291. Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. *Neuroreport.* 2000 Jun 26;11(9):1991-6. Doi: 10.1097/00001756-200006260-00037. PMID: 10884058.
292. Yeo, W., and Gautier, J. Early neural cell death: dying to become neurons. *Dev. Biol.* 2004. 274, 233–244. Doi: 10.1016/j.ydbio.2004.07.026

293. Yu, J. W., Jeffrey, P. D., & Shi, Y. Mechanism of procaspase-8 activation by c-FLIPL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009; 106(20): 8169–8174.
294. Zhang J., Cado D., Chen A., Kabra N.H., Winoto A., Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature*. 1998; 392:296–300.
295. Zhao C, Teng EM, Summers RG Jr, Ming GL, Gage FH. Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2006;26(1):3-11.
296. Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., & Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to *C. Elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3), 405-413.

