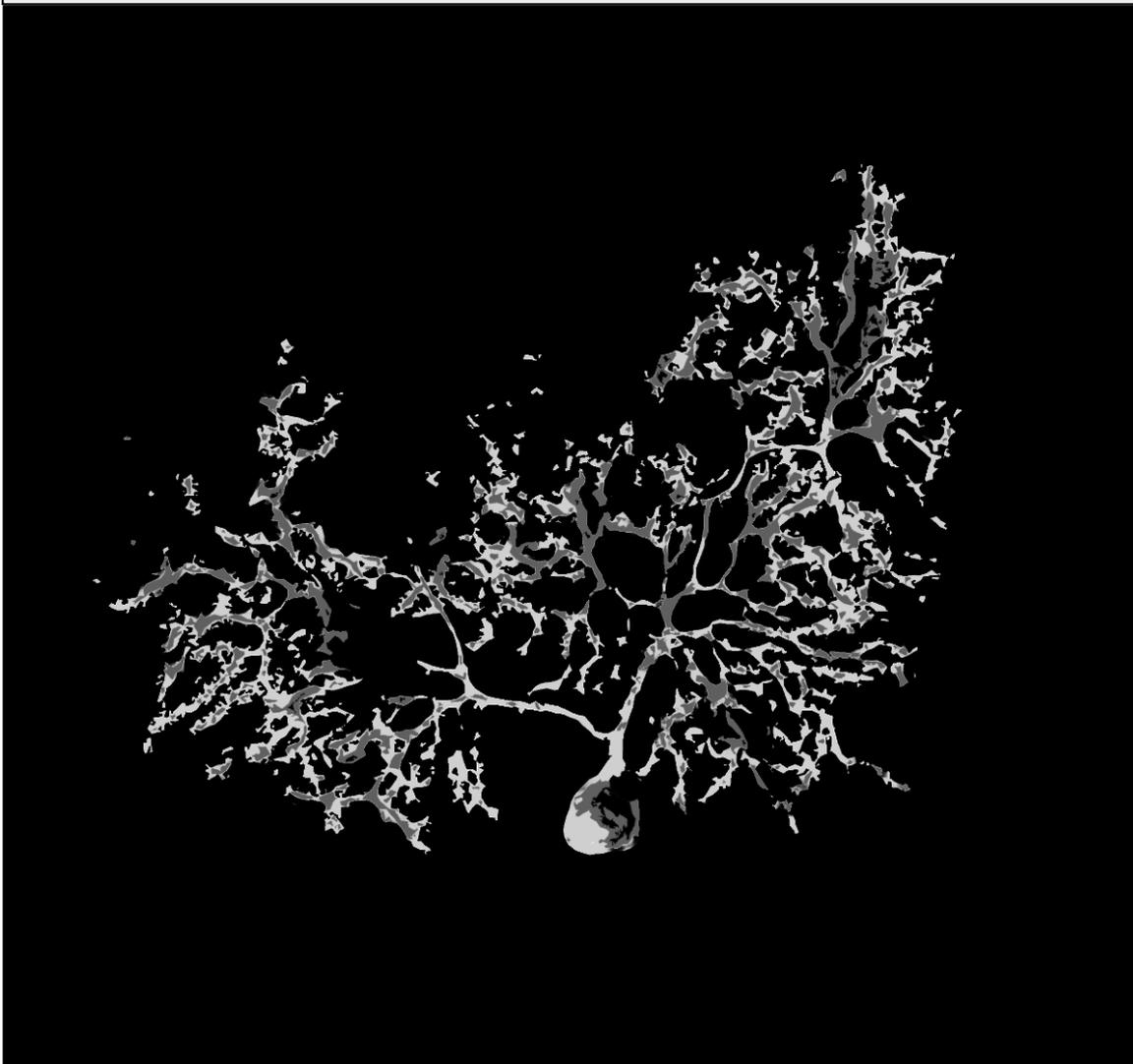


VNiVERSiDAD D SALAMANCA

TESIS DOCTORAL | DOCTORAL THESIS

FACTORES NEUOTRÓFICOS Y SU EFECTO NEUROPROTECTOR EN UN
MODELO MURINO DE DEGENERACIÓN NEURONAL SELECTIVA



NEUROTROPHIC FACTORS AND THEIR NEUROPROTECTIVE EFFECT IN A
MURINE MODEL OF SELECTIVE NEURONAL DEGENERATION

LAURA PÉREZ REVUELTA

Salamanca, 2023



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

Departamento de Biología Celular y Patología

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

Laboratorio de Plasticidad Neuronal y Neuroreparación

Factores neurotróficos y su efecto neuroprotector en un modelo murino de degeneración neuronal selectiva

Tesis Doctoral presentada por

Laura Pérez Revuelta

para optar al grado de

Doctor en Neurociencias

por la Universidad de Salamanca

Dirigida por:

Prof. Dr. José Ramón Alonso Peña

Prof. Dr. David Díaz López

Salamanca, julio 2023



**UNIVERSIDAD
DE SALAMANCA**



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSITY OF SALAMANCA

Department of Cell Biology and Pathology

INSTITUTE OF NEUROSCIENCE OF CASTILE AND LEON

Neuronal Plasticity and Neurorepair Laboratory

Neurotrophic factors and their neuroprotective effect in a murine model of selective neuronal degeneration

A thesis submitted by

Laura Pérez Revuelta

To obtain the degree of

Doctor in Neuroscience

At university of Salamanca

Supervised by:

Prof. Dr. José Ramón Alonso Peña

Prof. Dr. David Díaz López

Salamanca, July 2023

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	1
EL CEREBELO.....	3
Características anatómicas y citoarquitectura.....	3
Sinaptología de los circuitos cerebelosos.....	6
Funciones del cerebelo.....	6
CONDCA: un nuevo tipo de enfermedad neurodegenerativa cerebelosa.....	8
EL RATÓN MUTANTE PCD.....	9
La mutación <i>pcd</i>	9
Efectos generales de la mutación <i>pcd</i>	12
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en la histología del cerebelo.....	13
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el comportamiento.....	16
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en la calidad mitocondrial.....	17
Estrategias terapéuticas en el modelo PCD.....	19
FACTORES NEUROTROFICOS.....	20
IGF-1.....	20
BDNF.....	22
VEGF-A.....	24
VEGF-B.....	26
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
MATERIAL Y MÉTODOS	33
ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	35
Colonia PCD.....	35
Genotipado de animales.....	36
DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL.....	39
ANÁLISIS GÉNICO.....	42
Extracción de muestras en fresco.....	42
Extracción del RNA total.....	43
Obtención del DNA complementario.....	43
PCR cuantitativa.....	44
Análisis de datos.....	45
ANÁLISIS PROTEICO.....	47
Preparación de las muestras y cuantificación de proteínas.....	47

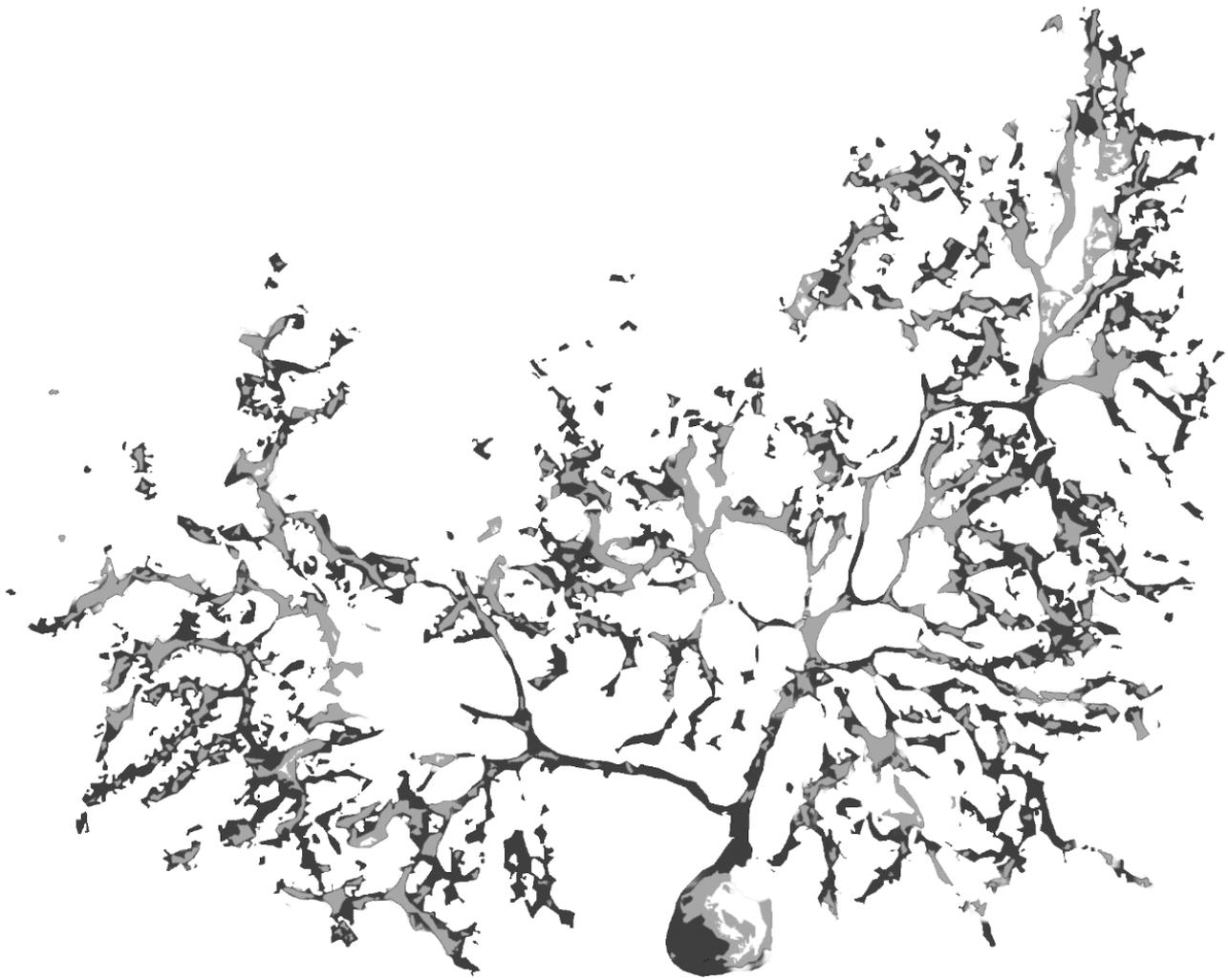
Procedimiento del ensayo	48
Interpretación de los resultados	48
TERAPIA CON FACTORES NEUOTRÓFICOS.....	49
ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MOTOR, COGNITIVO Y SOCIAL.....	50
Análisis de la memoria de reconocimiento	51
Análisis de preferencia social.....	53
Análisis del comportamiento motor	54
ANÁLISIS HISTOLÓGICO	55
Obtención y preparación del tejido: sacrificio y disección	55
Inmunofluorescencia indirecta	58
Hematoxilina-eosina.....	60
Técnica TUNEL	60
Visualización al microscopio y análisis de imagen.....	61
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	64
RESULTADOS	65
BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON EFECTO TERAPEUTICO	67
Cambios en la expresión génica de factores neurotróficos.....	67
Cambios en la expresión proteica de factores neurotróficos	71
TRATAMIENTO CON rhIGF-1.....	75
Efecto del tratamiento en el peso corporal.....	75
Efecto del tratamiento en el comportamiento	76
Efecto del tratamiento a nivel histológico	81
TRATAMIENTO CON rhVEGF-B I.....	84
Efecto del tratamiento en el peso corporal.....	84
Efecto del tratamiento en el comportamiento	85
Efecto del tratamiento a nivel histológico	90
TRATAMIENTO CON rhVEGF-B II.....	95
Efecto del tratamiento sobre el comportamiento	96
Efecto del tratamiento a nivel histológico	99
ANÁLISIS AVANZADO DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE rhVEGF-B.....	100
Análisis del músculo esquelético	101
Implicación de la mitocondria	102
DISCUSIÓN.....	111
BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON USO TERAPÉUTICO: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE IGF-1 Y VEGF-B EN EL RATÓN MUTANTE PCD	113
EL rhIGF-1 NO PRODUCE UN EFECTO NEUROPROTECTOR EN LOS RATONES PCD	116

El rhIGF-1 produce un aumento del peso corporal en los ratones PCD	117
El tratamiento con rhIGF-1 no influye en el comportamiento de los ratones PCD ni ralentiza su pérdida neuronal	117
EL rhVEGF-B EJERCE UN EFECTO NEUROPROTECTOR EN EL RATÓN PCD	120
Efecto de rhVEGF-B sobre el peso corporal	121
El rhVEGF-B mejora el comportamiento motor, cognitivo y social del ratón PCD	121
El tratamiento con rhVEGF-B produce un efecto neuroprotector sobre las células de Purkinje.....	122
La administración excesiva de rhVEGF-B puede tener efectos deletéreos	125
El tratamiento con rhVEGF-B no produce mejoras en el musculo esquelético.....	126
Análisis de la disfunción mitocondrial en el ratón PCD	127
CONCLUSIONES	135
ENGLISH SUMMARY	139
INTRODUCTION.....	141
HYPOTHESIS AND OBJECTIVES.....	143
MATERIAL AND METHODS	144
Animals and experimental design	144
Molecular analyses.....	145
Pharmacological therapy	146
Behavioral analyses	147
Histological and cytological analyses.....	147
Statistical analyses	149
RESULTS AND DISCUSSION	149
Changes in gene and protein expression of neurotrophic factors	149
rhIGF-1 treatment	152
rhVEGF-B treatment	155
CONCLUSIONS.....	165
BIBLIOGRAFÍA REFERENCES.....	167
APÉNDICE APPENDICE	183

ABREVIATURAS

AGTPBP1	Proteína de unión AGT/GTP 1 (del inglés <i>AGT/GTP Biding Protein 1</i>)
ANOVA	Análisis de la varianza (del inglés <i>ANalysis Of VAriance</i>)
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i>)
CCP1	Carboxipeptidasa citosólica 1 (del inglés <i>Cytosolic CarboxyPeptidase 1</i>)
CONDCA	Enfermedad neurodegenerativa de origen infantil con atrofia cerebelosa (del inglés <i>Childhood-Onset NeuroDegeneration with Cerebellar Atrophy</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DI	Índice de discriminación
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>DeoxyriboNucleic Acid</i>)
dUTP	Desoxiuridina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>)
ELA	Esclerosis lateral amiotrífica
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>)
IGF-1	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (del inglés <i>Insulin-like Growth Factor I</i>)
MTCO1	Subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa (Del inglés <i>Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I</i>)
NOR	Reconocimiento de objetos novedoso (del inglés <i>Novel Object Recognition</i>)
OMS	Organización mundial de la salud
P	Postnatal
Pb	Pares de bases
PB	Tampón fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffer</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCD	Degeneración de las células de Purkinje (del inglés <i>Purkinje Cell Degeneration</i>)
PCD-NaCl	PCD tratados con NaCl 0,9 %

PCD-rhIGF-1	PCD tratados con rhIGF-1
PCD-rhVEGFB	PCD tratados con rhVEGF-B
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PCx	Piruvato carboxilasa (del inglés <i>Pyruvate Carboxylase</i>)
r.p.m.	Revoluciones por minuto
rhIGF-1	Proteína recombinante humana IGF-1 (del inglés <i>Recombinant Human IGF-1</i>)
rhVEGF-B	Proteína recombinante humana VEGF-B (del inglés <i>Recombinant Human VEGF-B</i>)
SHMT2	serina hidroximetiltransferasa 2 (del inglés <i>Serine Hydroxymethyltransferase 2</i>)
SI	Índice de sociabilidad
SNC	Sistema nervioso central
TUNEL	Del inglés <i>Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling</i>
VEGF-A	Factor de crecimiento endotelial vascular A (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>)
VEGF-B	Factor de crecimiento endotelial vascular B (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor B</i>)
WT	Silvestre (del inglés <i>Wild Type</i>)



INTRODUCCIÓN

EL CEREBELO

Características anatómicas y citoarquitectura

El cerebelo es una estructura del Sistema Nervioso Central (SNC) localizada en la región dorsocaudal del encéfalo. Tiene una morfología anatómica que recuerda a un cerebro, y de ahí la etimología de su nombre, “cerebro pequeño”, derivado del latín *cerebellum* (Sillitoe y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013).

Macroscópicamente, el cerebelo se puede dividir en una porción medial, el **vermis**, flanqueado a ambos lados por el denominado **paravermis**, y dos regiones laterales, los **hemisferios cerebelosos**, que en ratones tienen aproximadamente el mismo tamaño que el vermis. Los flóculos y paraflóculos son extensiones laterales de los hemisferios que se extienden hacia la parte más externa del cerebelo, en su porción ventral (Figura 1 A; White y Sillitoe, 2013).

En un análisis en profundidad, se pueden diferenciar tres regiones con diferente histología que, desde la parte más externa a la más interna, son la corteza cerebelosa, la sustancia blanca y los núcleos cerebelosos profundos. La **corteza cerebelosa** se encuentra dispuesta en pliegues denominados laminas cerebelosas o *folia cerebelli*, que dividen la corteza en **lóbulos cerebelosos** (Sillitoe y Joyner, 2007). Se distinguen diez lóbulos que se denominan con números romanos –del I al X– desde la región más anterior a la más posterior (Figura 1 B). A su vez, la corteza está formada por tres capas que, desde la parte más superficial a la más interna, se denominan capa molecular, capa de las células de Purkinje y capa de los granos (Figura 2).

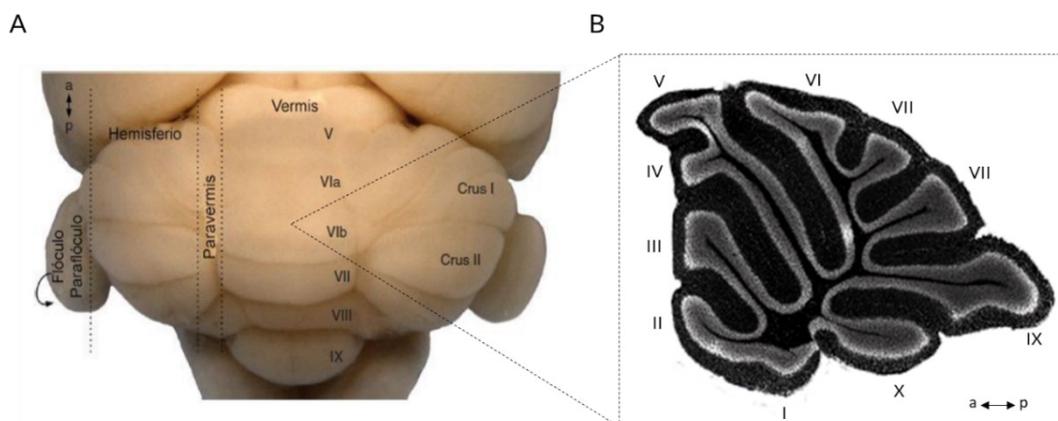


Figura 1. Vista macroscópica y citoarquitectura de un cerebelo de ratón. (A) Vista dorsal del cerebelo de un ratón adulto. Se aprecian las tres regiones principales: los hemisferios cerebelosos, la zona intermedia (paravermis) y el vermis. Modificado de White y Sillitoe, 2013. (B) Sección sagital del vermis cerebeloso, donde se han marcado la totalidad de los núcleos celulares con DAPI; en ella podemos apreciar los diez lóbulos enumerados del I al X. a, anterior; p, posterior.

Con respecto a la composición neuronal, la **capa molecular** presenta una alta densidad de fibras, principalmente las denominadas fibras paralelas y trepadoras (ver más adelante), así como los árboles dendríticos de las células de Purkinje subyacentes. En esta capa también podemos encontrar algunas neuronas, como células estrelladas y en cesto, que, como veremos más adelante, modulan la actividad de las células de Purkinje (Figura 2).

La **capa de las células de Purkinje** recibe su nombre debido a que estas neuronas son su tipo celular mayoritario. Adicionalmente, en esta capa también podemos encontrar células gliales especiales denominadas glía de Bergmann, y, en menor número, células en candelabro (Laine y Axelrad, 1994; Voogd y Glickstein, 1998). El soma de las células de Purkinje se encuentra dispuesto en una monocapa conformando este estrato celular, y su complejo árbol dendrítico se extiende hasta la capa superior adyacente, la capa molecular. Además, las células de Purkinje envían su axón a través la capa de los granos, más interna, hacia los núcleos cerebelosos profundos, siendo el axón de estas neuronas la única eferencia de la corteza cerebelosa. Por ello, son un elemento fundamental del circuito cerebeloso (Figura 2).

Finalmente, la capa más interna de la corteza cerebelosa es la **capa de los granos**, constituida mayoritariamente por unas pequeñas neuronas denominadas granos, junto con otras interneuronas como las células de Golgi, las células de Lugaro y las células unipolares en cepillo (Sillitoe y Joyner, 2007). Los granos cerebelosos son el tipo neuronal más abundante del encéfalo. Presentan unas dendritas cortas en forma de garra y envían sus axones hacia la capa molecular, donde se bifurcan formando las fibras paralelas (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007), perpendiculares a los árboles dendríticos de las células de Purkinje (Figura 2).

Finalmente, por debajo de la corteza cerebelosa encontramos la **sustancia blanca** formada mayormente por neuropilo, y los **núcleos cerebelosos profundos**, que en mamíferos se denominan núcleo fastigial, núcleo interpósito y núcleo dentado (Voogd y Glickstein, 1998). Los núcleos cerebelosos profundos son el segundo elemento clave del circuito cerebeloso, ya que dan lugar a la única vía eferente de todo el cerebelo, tras haber recibido la información procesada en la corteza cerebelosa, mediante las eferencias de las células de Purkinje (Figura 2).

Además, en todos los estratos cerebelosos también encontramos células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y microglía), que desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del cerebelo, al igual que en el resto del SNC (Sousa *et al.*, 2017; Subhramanyam *et al.*, 2019). Cabe destacar la ya mencionada glía de Bergmann, fundamental para el desarrollo embrionario de esta región encefálica (Laine y Axelrad, 1994; Voogd y Glickstein, 1998).

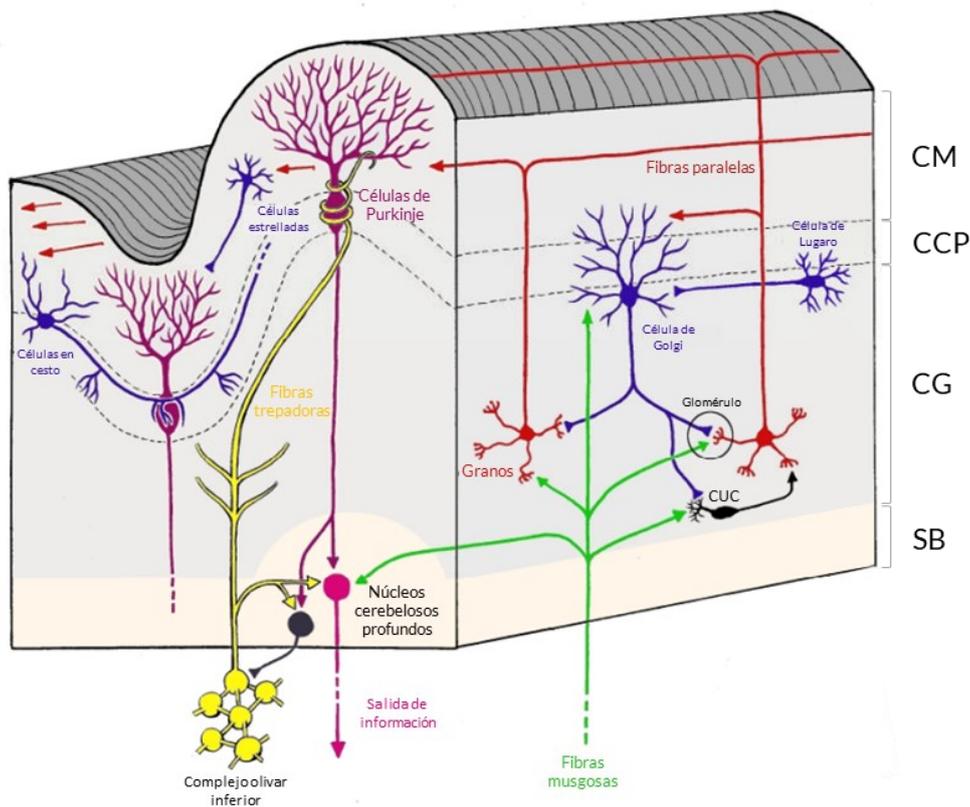


Figura 2. Representación esquemática de la estructura trilaminar de la corteza cerebelosa y sus tipos neuronales principales. En la capa molecular se localizan las células en cesto y las células estrelladas, junto con un abundante neuropilo constituido principalmente por las dendritas de las células de Purkinje, los axones de los granos (fibras paralelas) y las fibras trepadoras. A continuación, se localiza la capa de las células de Purkinje, formada por los grandes somas de las neuronas con el mismo nombre. La capa más interna, localizada sobre la sustancia blanca, es la capa de los granos, compuesta por numerosas neuronas de pequeño tamaño denominadas granos, además de otras interneuronas, como las células de Golgi, las células de Lugaro y las células unipolares en cepillo. La entrada de la transmisión nerviosa al cerebelo se produce a través de las fibras musgosas y trepadoras, que envían su información a la corteza cerebelosa, emitiendo a su vez colaterales a los núcleos cerebelosos profundos. La información de la corteza, una vez procesada, sale por los axones de las células de Purkinje hacia los núcleos cerebelosos profundos, y de estos a otras regiones fuera del cerebelo. CUC: células unipolares en cepillo; CM: capa molecular; CCP: capa de células de Purkinje; CG: capa de los granos; SB: sustancia blanca. Modificada de Ward, 2012.

Sinaptología de los circuitos cerebelosos

El cerebelo es una estructura altamente conectada con otras regiones del encéfalo. Las células de Purkinje reciben sinapsis excitatorias principalmente de dos vías aferentes: las fibras musgosas y las fibras trepadoras. Las **fibras musgosas** proceden de múltiples regiones del SNC y establecen sinapsis excitatorias con los granos que, junto con las células unipolares en cepillo, forman estructuras complejas denominadas glomérulos (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007). Por otro lado, las **fibras trepadoras**, que proceden del complejo olivar inferior, atraviesan la capa de los granos y se colocan alrededor de las dendritas de las células de Purkinje, estableciendo sobre éstas numerosos contactos sinápticos (Figuras 2 y 3, Voogd y Glickstein, 1998). Por otra parte, las células de Purkinje se encuentran inhibidas por las células en cesto –que contactan con su soma–; las células estrelladas, –a través del tronco de sus dendritas principales– y las células de Golgi, excitadas a su vez por las fibras paralelas de los granos (Figura 3; Voogd y Glickstein, 1998).

Finalmente, una vez integrada toda la información que llega a la corteza cerebelosa, las células de Purkinje la envían a través de sus axones hacia los núcleos cerebelosos profundos, estableciendo sinapsis inhibitorias. Cada uno de los núcleos cerebelosos profundos, a su vez, envía sus proyecciones a regiones encefálicas específicas (Figura 3; Voogd y Glickstein, 1998). Por tanto, tal y como se explicó anteriormente, las células de Purkinje constituyen la única eferencia de la corteza cerebelosa, y los núcleos cerebelosos profundos con los que contactan, son la única salida de la información del cerebelo.

En general, la conectividad del cerebelo desempeña un papel fundamental en el control motor y la función cognitiva, de manera que las alteraciones de estas conexiones pueden provocar una serie de trastornos neurológicos.

Funciones del cerebelo

El cerebelo se considera un centro de integración de la información sensoriomotora para el control del movimiento, el mantenimiento de la postura y el aprendizaje motor (Ito, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007; Manto *et al.*, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas, se han realizado múltiples investigaciones que han proporcionado evidencia suficiente para reevaluar las funciones del cerebelo.

De acuerdo con diversos autores, esta región encefálica se considera esencial para la integración de procesos cognitivos, emocionales y sociales, así como para el procesamiento del lenguaje, la atención, el aprendizaje y la memoria (Reeber *et al.*, 2013; Vožeh, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; van der Heijden *et al.*, 2021). Por lo tanto, actualmente podemos considerar al cerebelo no solo como una estructura motora, sino como un potente integrador del comportamiento cognitivo y social.

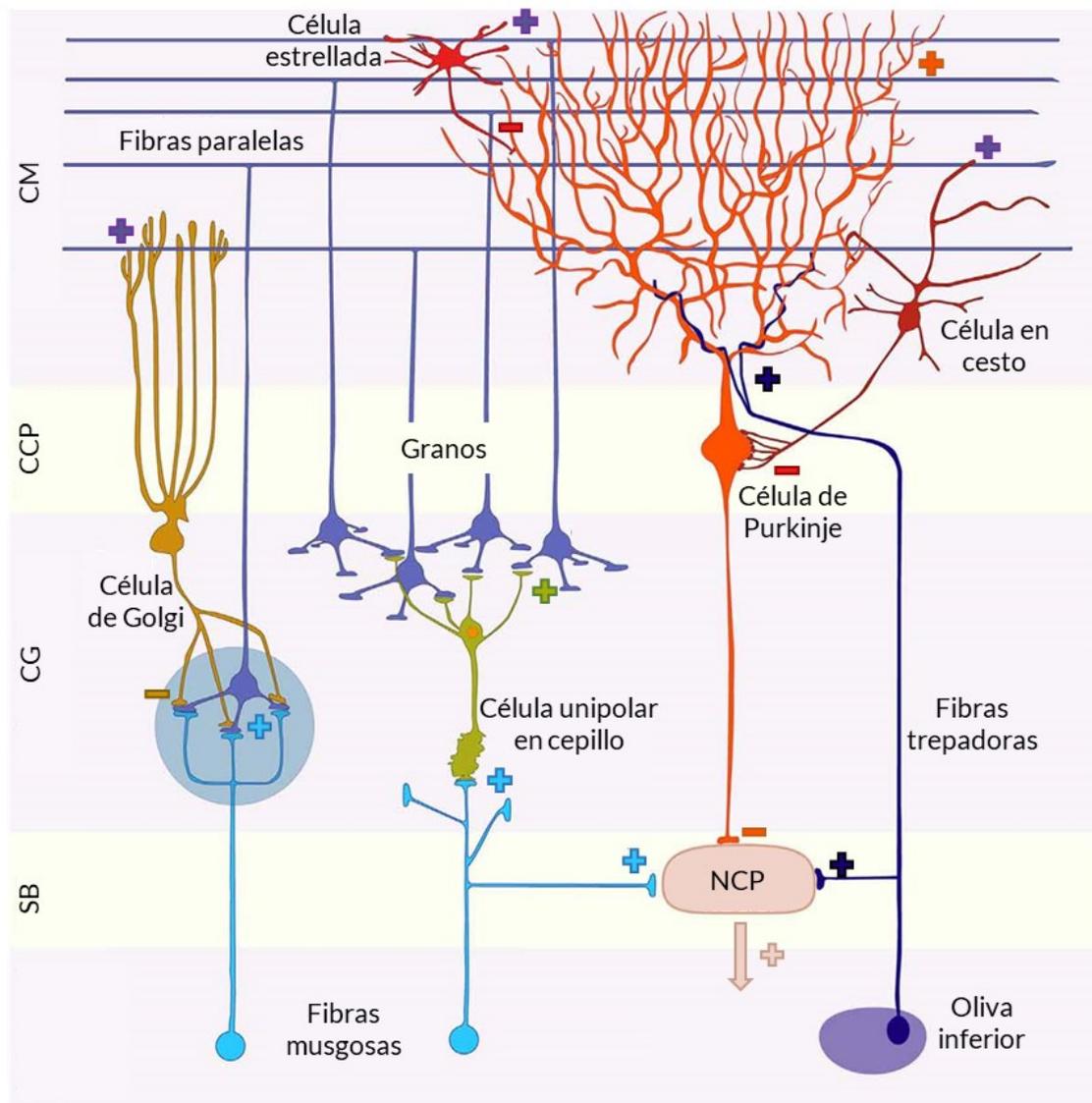


Figura 3. Esquema de los circuitos cerebelosos. Se pueden observar las principales vías aferentes, las fibras musgosas y trepadoras, así como los cinco tipos neuronales principales del cerebelo. + sinapsis excitadora; - sinapsis inhibitoria, con el color de la neurona presináptica. CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; SB, sustancia blanca. Modificado de (Consalez *et al.*, 2020).

CONDCA: un nuevo tipo de enfermedad neurodegenerativa cerebelosa

Las enfermedades neurodegenerativas son un grupo de trastornos del SNC que se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas en diferentes áreas nerviosas. Estas enfermedades son un problema de salud pública cada vez más importante debido a su prevalencia, morbilidad y mortalidad, según la Organización Mundial de la Salud (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369>). Dentro de las diferentes enfermedades neurodegenerativas, queremos hacer hincapié en las ataxias cerebelosas, por su relevancia en esta Tesis Doctoral. Se trata de un tipo de enfermedades neurodegenerativas provocadas, principalmente, por la muerte de poblaciones neuronales del cerebelo. Dada la importancia de esta estructura en el control motor, las ataxias están caracterizadas por una disfunción en los movimientos en cuanto a su sincronización, extensión y variabilidad. Además, aparecen alteraciones en el equilibrio, el control oculomotor, así como la cognición y el afecto, síntomas que repercuten significativamente en la capacidad funcional y la calidad de vida (Zhang *et al.*, 2021).

En este sentido, varios estudios recientes han identificado una nueva enfermedad neurodegenerativa de origen infantil con atrofia cerebelosa denominada CONDCA¹ por sus siglas en inglés, que afecta a las células de Purkinje del cerebelo, causando una ataxia grave desde edades muy tempranas (Shashi *et al.*, 2018; Karakaya *et al.*, 2019; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021). Esta enfermedad se origina debido a la pérdida de función de la proteína AGTPBP1², que actúa como una carboxipeptidasa citosólica. Afortunadamente, existe un modelo animal que presenta una mutación y proceso neurodegenerativo similares a los que se observan en los pacientes con CONDCA, el ratón mutante PCD (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*; (Mullen *et al.*, 1976; Blanks *et al.*, 1982; Greer y Shepherd, 1982; Fernández-González *et al.*, 2002). Dada su relevancia en la presente Tesis Doctoral, la descripción de este modelo animal merece un capítulo aparte.

Además, diversas líneas de investigación recientes proponen que las alteraciones cerebelosas también afectan otro tipo de funciones aparte de las motoras, como las de tipo cognitivo, afectivo o mnémico (ver más arriba). Un ejemplo muy llamativo es que ciertas alteraciones cerebelosas parecen relacionadas con el desarrollo de los Trastornos del Espectro Autista, donde se ha observado una pérdida –en mayor o menor medida–, de las células de Purkinje (Fatemi *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012; Bozdagi *et al.*, 2013).

¹ Del inglés *Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy*

² Del inglés *ATP/GTP Binding Protein*

En este sentido, el ratón mutante PCD también se erige como un modelo animal de desestructuración cerebelosa y alteraciones cognitivo-afectivas.

EL RATÓN MUTANTE PCD

El uso de modelos animales de experimentación ha proporcionado importantes beneficios en la medicina y la investigación científica en general. Su empleo sigue siendo una herramienta imprescindible para obtener resultados que se extienden desde la investigación de mecanismos fisiológicos, hasta el estudio de enfermedades, así como el desarrollo y evaluación de nuevas estrategias terapéuticas.

Por ello, en la presente Tesis Doctoral se ha empleado el ratón mutante PCD, un modelo de degeneración postnatal y selectiva de diferentes poblaciones neuronales, entre ellas las células de Purkinje del cerebelo (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007). Similar a la CONDCA, el resultado de esta mutación es una atrofia cerebelosa acompañada de alteraciones en el comportamiento motor, afectivo y social (Baltanás *et al.*, 2013; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), que hacen del PCD un modelo animal ideal para investigar las opciones terapéuticas que prevengan, o al menos atenúen, el curso neurodegenerativo en pacientes con CONDCA, así como otros casos de desestructuración cerebelosa.

La mutación *pcd*

La mutación *pcd* se localiza en el cromosoma 13 del ratón –en el 9 en humanos afectados por CONDCA– y se define como autosómica recesiva (Mullen *et al.*, 1976). El gen afectado ha recibido varios nombres tales como *Nna1*³, *Agtpbp1* y *Ccp1*⁴.

La mutación original, denominada *Agtpbp1^{pcd}*, apareció espontáneamente en la estirpe de ratón C57BR/cdJ (*Mus musculus* L.1758) en los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EE. UU.). Posteriormente, la mutación se transfirió a la estirpe C57BL/6J, y fue descrita por primera vez por el equipo de Mullen en 1976 (Mullen *et al.*, 1976). En la actualidad, se han identificado 25 variables alélicas del gen *Agtpbp1* en diferentes modelos animales y líneas celulares (Tabla 1), surgidas de forma espontánea o bien generadas por inducción química o mutagénesis dirigida (Baltanás *et al.*, 2021; Pérez-Martín *et al.*, 2021). La variante alélica empleada en la presente Tesis Doctoral es la conocida como *1J* o *Agtpbp1^{pcd1J}*, y que denominaremos en adelante como *pcd^{1J}*.

³ Del inglés *Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy*

⁴ Del inglés *Cytosolic Carboxypeptidase 1*

Se trata de la variante original y la que produce las alteraciones patológicas más graves (Fernández-González *et al.*, 2002; Wang y Morgan, 2007).

El gen afectado por la mutación *pcd* codifica para la encima CCP1, cuya función principal es realizar modificaciones postraduccionales en los microtúbulos, eliminando los residuos de ácido glutámico en el extremo C-terminal de las tubulinas (Kalinina *et al.*, 2007; Rogowski *et al.*, 2010; Berezniuk *et al.*, 2012; Rodríguez de la Vega Otazo *et al.*, 2013). Debido a ello, la ausencia de la actividad de CCP1 provoca la hiperglutamilación de los microtúbulos, relacionada con el comienzo de los procesos neurodegenerativos de las células de Purkinje (Wang *et al.*, 2006; Rogowski *et al.*, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Shashi *et al.*, 2018) y probablemente del resto de neuronas afectadas. Sin embargo, también se conocen otras alteraciones provocadas por la inactividad de la enzima CCP1 relacionadas con la estructura y organización del nucleolo o de la dinámica y estabilidad mitocondrial (Valero *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Gilmore-Hall *et al.*, 2019), entre otras.

Tabla 1. Origen, tipo de mutación y características clínicas de las distintas variantes alélicas de la mutación *pcd*. IQ: inducido químicamente; CP: células de Purkinje; CMs: células mitrales. Modificado de Pérez-Martín, 2022. ►

Nombre alelo	Origen	Mutación genética	Características clínicas
<i>Agtpbp1^{pcd1J}</i>	Espontánea	Desconocida (posiblemente en la región reguladora)	Tamaño corporal reducido, ataxia y alteraciones cognitivo-afectivas, atrofia cerebelosa, degeneración de CP, CMs y granos, neuronas talámicas, fotorreceptores, infertilidad en machos y fertilidad parcial en hembras
<i>Agtpbp1^{pcd2J}</i>	Espontánea	Inserción (~7,8 Kb) en intrón 13	Alelo hipomórfico, ataxia tardía, algunos casos de infertilidad masculina
<i>Agtpbp1^{pcd3J}</i>	Espontánea	Delección (~12,2 Kb) entre intrón 5 y exón 8	Tamaño corporal reducido, ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración de CP, CMs, neuronas talámicas, fotorreceptores, infertilidad en machos y fertilidad parcial en hembras
<i>Agtpbp1^{pcd4J}</i>	IQ	Inserción 6 nucleótidos entre exones 6 y 7	Ataxia, degeneración de CP
<i>Agtpbp1^{pcd5J}</i>	Espontánea	Inserción de triplete del ácido aspártico en exón 18 (p. 775D)	Ataxia, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, fertilidad parcial en hembras e infertilidad en machos
<i>Agtpbp1^{pcd6J}</i>	IQ	Desconocida	Ataxia, atrofia cerebelosa y de los testículos, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, menor tamaño de fibras musculares esqueléticas, infertilidad en machos
<i>Agtpbp1^{pcd7J}</i>	Espontánea	Desconocida	Tamaño corporal reducido, ataxia, degeneración de CP, hipocampo agrandado, problemas auditivos, cambios del comportamiento
<i>Agtpbp1^{pcd8J}</i>	Espontánea	Desconocida	Alteración del desarrollo del sistema nervioso, reproductor y visual
<i>Agtpbp1^{pcd9J}</i>	Espontánea	Inserción A en exón 11	Ataxia tardía
<i>Agtpbp1^{pcd-JWG}</i>	Inserción transgénica	Inserción aleatoria de 4,4 Kb del gen <i>Dhfr</i> y promotor SV40	Ataxia, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, infertilidad parcial de machos y hembras, degeneración del esperma.
<i>Agtpbp1^{pcd-m2Btlr (rio)}</i>	IQ	Cambio A > G; destruye el sitio de empalme del intrón 7	Temblor, tamaño corporal reducido, ataxia y alteración del comportamiento motor
<i>Agtpbp1^{pcd-m3Btlr}</i>	IQ	Cambio A > T; ácido aspártico por valina (p. D954V)	Tamaño corporal reducido, ataxia y alteración del comportamiento motor
<i>Agtpbp1^{pcd-Sid}</i>	Espontánea	Delección del exón 7	Tamaño corporal reducido, ataxia, degeneración de CP y atrofia cerebelosa
<i>Agtpbp1^{atms}</i>	Espontánea (<i>Knock out</i>)	Cambio G > C en exón 17; prolina por arginina (p.P808R)	Ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración postnatal de CP y fotorreceptores, infertilidad en machos
<i>Agtpbp1^{babe}</i>	IQ	Cambio de C > T produce codón de parada en arginina (p. P804X)	Ataxia y paraparesia
<i>Agtpbp1^{drunk}</i>	IQ	Cambio de T > A en sitio de empalme del intrón 11	Ataxia, degeneración de CP, CMs y fotorreceptores, infertilidad en machos y oligozoospermia
<i>Pcd^{KO}</i>	Knock-out	Delección de exones 21 y 22	Ataxia, atrofia cerebelosa, degeneración postnatal de CP y fotorreceptores

Efectos generales de la mutación *pcd*

El efecto de la mutación *pcd* es la degeneración postnatal y selectiva de ciertas poblaciones neuronales en los que se ha observado una mayor expresión del gen *Ccp1*, tales como las células de Purkinje del cerebelo –síntoma más llamativo y que da nombre al modelo–, las células mitrales del bulbo olfativo, los fotorreceptores de la retina y determinadas poblaciones talámicas (Fernández-González *et al.*, 2002). Asimismo, los espermatozoides también se ven afectados por la mutación (Fernández-González *et al.*, 2002). Sin embargo, la degeneración de las mencionadas poblaciones neuronales no discurre de forma similar, sino que el comienzo y el progreso de la muerte celular es distinto. Ello convierte al ratón PCD en un modelo muy versátil para el estudio de diversas enfermedades neurodegenerativas, además de la CONDCA, así como para el desarrollo de distintas aproximaciones terapéuticas, por presentar varios escenarios degenerativos de distinta gravedad.

En primer lugar, ocurre la degeneración de las células de Purkinje –la más rápida y drástica–, de forma que a los 40 días de edad postnatal (P40) apenas encontramos neuronas de este tipo (Landis y Mullen, 1978), lo que provoca una ataxia cerebelosa muy grave (Mullen *et al.*, 1976). Además, se ha observado una degeneración secundaria en la capa molecular y de los granos, así como en los núcleos cerebelosos profundos (Wassef *et al.*, 1986; Baürle *et al.*, 1997; Blosa *et al.*, 2016; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). De forma más tardía, entre P50 y P120, se produce la degeneración de las células mitrales del bulbo olfativo principal, con la consecuente degeneración del tracto olfativo lateral (Mullen *et al.*, 1976; Greer y Shepherd, 1982; Bartolomei y Greer, 1998; Valero *et al.*, 2006; Recio *et al.*, 2007) provocando una reducción en la capacidad de detección y discriminación olfativa en los ratones PCD (Díaz *et al.*, 2012a). Además, también se observa la degeneración de determinadas neuronas de los núcleos talámicos, muriendo el 90% de las neuronas a P90 (O'Gorman, 1985). La degeneración de los fotorreceptores se produce de manera lenta y gradual, presentando características similares a la retinosis pigmentaria (Blanks *et al.*, 1982; Marchena *et al.*, 2011). Por otro lado, recientemente se ha descubierto la degeneración tardía de las motoneuronas de la médula espinal en ratones PCD de siete meses de edad (Shashi *et al.*, 2018). Finalmente, la mutación *pcd* provoca esterilidad en machos homocigotos debido a una menor producción de espermatozoides, que además presentan una morfología aberrante y poca movilidad (Kim *et al.*, 2011).

Sin embargo, las hembras mutantes son fértiles, aunque se ha observado serias dificultades en la cría de la escasa descendencia que producen (Mullen *et al.*, 1976).

En la presente Tesis Doctoral nos centraremos en la afectación cerebelosa del ratón PCD, por ser la más agresiva y por tener una aplicación traslacional más directa.

Efectos de la mutación *pcd* en la histología del cerebelo

Proceso degenerativo de las células de Purkinje

El fenotipo PCD se asocia con una drástica y prematura degeneración primaria de las células de Purkinje, que comienza en el vermis y que progresivamente avanza hacia los hemisferios (Zhang *et al.*, 1997). Esta neurodegeneración comienza durante el desarrollo postnatal temprano, observándose muerte celular en torno a P18. Sin embargo, se han descrito cambios en la expresión génica, así como alteraciones citoplasmáticas y nucleares previas a la muerte celular, en torno a P15 (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por ello, se puede dividir el proceso neurodegenerativo en dos etapas: la **etapa preneurodegenerativa** desde P15 a P18, cuando se detectan daños citológicos, pero no muerte celular, y la **etapa degenerativa** propiamente dicha desde P18 en adelante, cuando la muerte de las células de Purkinje es evidente. Curiosamente, se ha observado en los ratones heterocigotos para la mutación *pcd* (*+/pcd*) una reducción significativa en el número de células de Purkinje a P300, por lo que esta mutación puede estar afectando el proceso de envejecimiento celular (sin descartar casos espontáneos de silenciamiento génico en edades avanzadas), provocando una degeneración celular moderada (Doulazmi *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2012b).

La etapa preneurodegenerativa se caracteriza por diversos cambios estructurales y alteraciones en la citoarquitectura de las células de Purkinje (Li *et al.*, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Baltanás *et al.*, 2019), incluidos el soma, las dendritas y los axones (Baltanás *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2018). En este sentido, se ha observado una acumulación de orgánulos y densificación citoplasmática (Baltanás *et al.*, 2013). Por otro lado, la pérdida de función de CCP1 afecta al desarrollo y arquitectura del árbol dendrítico, aunque estas alteraciones no parecen estar implicadas directamente en la muerte celular (Li *et al.*, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018).

Además, aparecen unos engrosamientos anormales en los axones denominados torpedos, relacionados con alteraciones en las sinapsis (Baltanás *et al.*, 2013).

Otra característica de esta etapa preneurodegenerativa es la acumulación de polirribosomas libres (Landis y Mullen, 1978; Li *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2020), que se correlaciona con el estrés del retículo endoplasmático en las células de Purkinje de los ratones PCD (Kyuhou *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2020). Estas alteraciones se agravan a medida que avanza la neurodegeneración, de forma que los polirribosomas se disocian en ribosomas libres citoplasmáticos, que son finalmente introducidos en vacuolas autofágicas (Baltanás, *et al.*, 2011b). Otras alteraciones a nivel citoplasmático incluyen la aparición de nematosomas, que son inclusiones citoplasmáticas formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa. Los nematosomas se observan ocasionalmente a P15, y con más regularidad a partir de P18-P22 (Grillo, 1970).

Por otro lado, la mutación *pcd* provoca cambios en los compartimentos nucleares de las células de Purkinje implicados en la transcripción del RNA, y en el procesamiento y reparación del daño del DNA. Durante la etapa de preneurodegeneración, en las células de Purkinje se produce una reorganización progresiva de la cromatina en grandes dominios de heterocromatina transcripcionalmente silenciosos, asociados con la acumulación de daños en el DNA no reparado, siendo uno de los primeros signos del daño neuronal (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019). Estos daños producen cambios en otros compartimentos nucleares, siendo particularmente evidentes en el nucleolo, que presenta una alteración progresiva de los componentes fibrilar y granular (Baltanás *et al.*, 2011b, 2019). Las alteraciones nucleolares se correlacionan directamente con el aumento del estrés nucleolar y la biogénesis defectuosa de los ribosomas (Baltanás *et al.*, 2011b, 2019). Curiosamente, el estrés nucleolar se relaciona con la aparición de enfermedades neurodegenerativas en humanos, como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), entre otras (Rieker *et al.*, 2011; Hetman y Pietrzak, 2012; Haeusler *et al.*, 2014; Hernández-Ortega *et al.*, 2016; Garcia-Esparcia *et al.*, 2017; Tapia *et al.*, 2017).

Cambios en otras poblaciones neuronales del cerebelo

Como consecuencia de la degeneración primaria de las células de Purkinje en el ratón PCD, se produce la degeneración secundaria de otros elementos neuronales. En primer lugar, se ha observado una degeneración retrógrada que afecta al 90% de los granos (Wang y Morgan, 2007; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), aunque hay indicios de que la muerte de estas neuronas también pueda deberse –al menos en parte– al efecto directo de la mutación (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por otro lado, tal y como se ha descrito anteriormente, las dos principales vías aferentes del cerebelo son las fibras musgosas y las fibras trepadoras. Estas últimas se originan en el complejo olivar inferior y establecen conexión directa con las células de Purkinje (Voogd y Glickstein, 1998). Por ello, la muerte de estas células, dianas de dichas aferencias, provoca la muerte de aproximadamente el 50% de las neuronas del complejo olivar inferior a P300 (Ghetti *et al.*, 1987; Triarhou y Ghetti, 1991; Zhou *et al.*, 2018). Por último, se produce la degeneración de alrededor del 30% de las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos en etapas más tardías, a lo largo del primer año de vida postnatal (Wassef *et al.*, 1986; Triarhou *et al.*, 1987; Blosa *et al.*, 2016).

Además, debido a la degeneración tan rápida y agresiva de las células de Purkinje en los ratones mutantes, se produce una reacción inflamatoria exacerbada, caracterizada por una gliosis reactiva grave, un aumento en la expresión de genes que codifican factores proinflamatorios y un aumento en la infiltración de leucocitos hacia el cerebelo (Kyuhou *et al.*, 2006; Baltanás *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2018; del Pilar *et al.*, 2021). Más aún, los oligodendrocitos y sus precursores se ven muy afectados en la corteza cerebelosa (Baltanás *et al.*, 2013).

Por otro lado, se produce una reorganización de los circuitos cerebelosos en ratones PCD tras la muerte neuronal. La degeneración de la principal vía eferente inhibitoria procedente de las células de Purkinje reduce la inervación inhibitoria GABAérgica y disminuye la densidad de receptores GABA_A en los núcleos cerebelosos profundos y en el núcleo vestibular (Grüsser-Cornehls y Bäurle, 2001; Blosa *et al.*, 2016). Ello provoca un aumento del sistema glicinérgico en los núcleos cerebelosos profundos (Blosa *et al.*, 2016), propiciado, a su vez, por una mayor inervación de los mismos por fibras musgosas (Blosa *et al.*, 2016).

Finalmente, el sistema serotoninérgico en el ratón PCD se vuelve completamente disfuncional una vez que las células de Purkinje degeneran, ya que las neuronas serotoninérgicas de los núcleos del rafe y otras áreas encefálicas proyectan hacia las células de Purkinje y los granos (Ghetti *et al.*, 1988). Sin embargo, los terminales axónicos noradrenérgicos del *locus coeruleus* que llegan a la corteza cerebelosa se conservan en ratones PCD a pesar de la ausencia de las células de Purkinje, que son sus dianas principales (Roffler-Tarlov *et al.*, 1984; Felten *et al.*, 1986). En cuanto al sistema dopaminérgico, se ha observado que la pérdida de células de Purkinje induce un aumento de los niveles de transportadores de dopamina en los núcleos cerebelosos profundos, pero, al mismo tiempo, produce una reducción de estos niveles en la capa molecular de la corteza cerebelosa (Delis *et al.*, 2004).

Efectos de la mutación *pcd* en el comportamiento

El cerebelo se considera un centro de integración esencial de la información sensoriomotora, así como el principal responsable de la coordinación y control del movimiento, el mantenimiento de la postura y el aprendizaje motor (Ito, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007). Sin embargo, en los últimos años, varios autores han encontrado evidencias de que el cerebelo cumple una función esencial en el procesamiento de la información cognitiva, afectiva y social, y participa en tareas como el lenguaje, la atención, el aprendizaje y la memoria (Reeber *et al.*, 2013; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; van der Heijden *et al.*, 2021).

La característica fenotípica más representativa de los ratones mutantes PCD es la ataxia cerebelosa, causada por la muerte de las células de Purkinje y que está presente desde la tercera semana de vida postnatal (Landis y Mullen, 1978; Le Marec y Lalonde, 1997; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). El estudio de la marcha atáxica en los ratones mutantes reveló pasos irregulares, espaciados y más cortos en mutantes de cuatro semanas de edad, déficit que empeora a medida que avanza la degeneración cerebelosa (Landis y Mullen, 1978; Le Marec y Lalonde, 1997; Wang y Morgan, 2007; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Lalonde y Strazielle, 2019; Machado *et al.*, 2020). Asimismo, los ratones PCD presentan una disminución de la coordinación de los movimientos corporales (Le Marec y Lalonde, 1997), así como déficits de coordinación entre las extremidades delanteras y traseras (Machado *et al.*, 2015) y debilidad muscular (Gilmore-Hall *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2018).

Por otro lado, los efectos de la disfunción cerebelosa sobre el aprendizaje espacial y memoria a largo plazo en ratones PCD adultos se determinaron mediante el uso de las pruebas del laberinto acuático de Morris y de reconocimiento de objetos novedosos (NOR⁵), respectivamente (Goodlett *et al.*, 1992; Lalonde y Strazielle, 2003; Tuma *et al.*, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por su parte, la prueba de preferencia social reveló que la pérdida de células de Purkinje en los ratones PCD también afecta a las interacciones sociales (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por último, las pruebas de natación forzada han sugerido que los ratones mutantes presentan un comportamiento depresivo (Tuma *et al.*, 2015).

Efectos de la mutación *pcd* en la calidad mitocondrial

Existen numerosos ejemplos de ataxias cerebelosas en las que el producto génico defectuoso desempeña una función vital para la salud mitocondrial (Fogel y Perlman, 2007). Varios estudios sugieren que *Ccp1* debe unirse a la lista de genes de importancia crítica, ya que sus productos proteicos tienen una función insustituible en las mitocondrias de las neuronas (Gilmore-Hall *et al.*, 2019). En primer lugar, la proteína CCP1 se localiza en las mitocondrias (Chakrabarti *et al.*, 2009; Chakrabarti *et al.*, 2010). Por ello, se han observado anomalías mitocondriales, tanto morfológicas como funcionales, así como un aumento de la mitofagia y la disminución de actividades complejas de la cadena respiratoria en ratones PCD (Chakrabarti *et al.*, 2009). Análisis previos de nuestro laboratorio (no publicados) mostraron alteraciones mitocondriales en los ratones PCD, tanto en el número como en la morfología, siendo las mitocondrias mutantes más redondas y significativamente más pequeñas que las silvestres, además de observarse alteraciones en las crestas mitocondriales (Figura 4).

También se ha observado un aumento de la fragmentación mitocondrial, lo que promueve aún más la disfunción. En primer lugar, debemos comprender que la correcta dinámica mitocondrial requiere de un transporte axonal apropiado (Fransson *et al.*, 2006; Saotome *et al.*, 2008; Koutsopoulos *et al.*, 2010). Por tanto, el papel de *Ccp1* es de vital importancia en la regulación de la motilidad mitocondrial, principalmente para los procesos de fusión (Wang *et al.*, 2011; Gilmore-Hall *et al.*, 2019).

⁵ Del inglés *New Object Recognition test*

La correcta deglutamilación de la tubulina por CCP1 prepara a los microtúbulos para una interacción eficaz con la maquinaria de transporte mitocondrial, que permite a las mitocondrias moverse y fusionarse entre sí. Sin embargo, el transporte axonal retrógrado y anterógrado está reducido en neuronas cerebelosas procedentes de ratones PCD (Gilmore-Hall *et al.*, 2019).

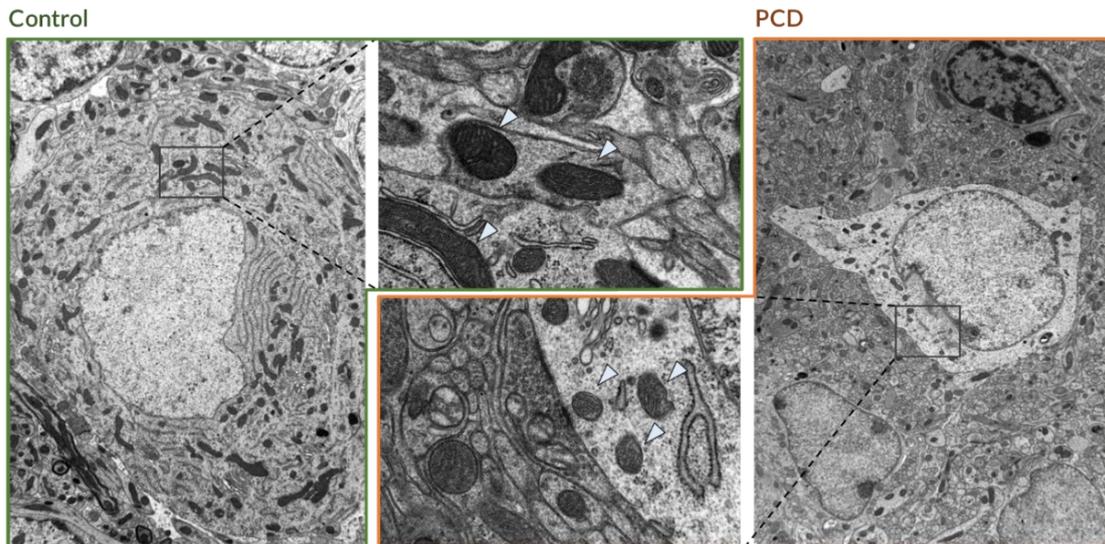


Figura 4. Micrografía tomada mediante microscopía electrónica de transmisión de una célula de Purkinje de un ratón control (verde) y PCD (naranja). En la parte central se muestra una ampliación de cada imagen, en la que se puede apreciar la alteración en la morfología mitocondrial presente en los ratones PCD.

Como se ha comentado anteriormente, en los ratones mutantes PCD existe una neurodegeneración específica varios tipos celulares, donde observamos diferencias tanto en la gravedad como en el momento en el que se produce (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007). Las células de Purkinje se encuentran entre los subtipos neuronales más activos eléctricamente y poseen dendritas ampliamente subdivididas que forman una red masiva de contactos sinápticos, así como largas proyecciones axonales con numerosos objetivos neuronales. Esta citoarquitectura exige que las células de Purkinje sean capaces de producir continuamente enormes cantidades de ATP y, por lo tanto, estas neuronas no pueden tolerar la caída en la producción de energía que ocurre en el ratón PCD (Gilmore-Hall *et al.*, 2019). Esta puede ser una explicación más para la rápida y agresiva degeneración de las células de Purkinje del ratón PCD, en comparación con otros tipos neuronales menos afectados por la mutación.

Estrategias terapéuticas en el modelo PCD

Debido a la muerte neuronal primaria y a la aparición de procesos neurodegenerativos secundarios que presenta el ratón mutante PCD, este modelo ha sido ampliamente estudiado para investigar nuevas estrategias neuroprotectoras que prevengan –o al menos atenúen– la neurodegeneración. Los principales enfoques experimentales evaluados tienen como objetivo revertir la degeneración cerebelosa de los ratones mutantes. Destacan la terapia con células madre (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012; Díaz *et al.*, 2019), la terapia génica (Wang *et al.*, 2006; Chakrabarti *et al.*, 2008; Magiera *et al.*, 2018), y el uso de moléculas con carácter neuroprotector, tanto aquellas potenciadas naturalmente tras el ejercicio físico (Nishijima *et al.*, 2016) como administradas exógenamente (ver a continuación). En este apartado, detallaremos alguna de las terapias farmacológicas más usadas por tener especial interés en esta Tesis Doctoral.

Las terapias farmacológicas tienen como fin proteger y preservar las células de Purkinje mediante la administración de moléculas neuroprotectoras. Así, la administración del factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1⁶), un factor neurotrófico altamente utilizado para tratar varios trastornos neurodegenerativos, provocó un aumento significativo del peso corporal y la supervivencia de las células de Purkinje, y mejoró el rendimiento motor en ratones PCD (Torres-Alemán *et al.*, 1996; Carrascosa *et al.*, 2004). Además, la administración de IGF-1 en pacientes con ataxia cerebelosa autosómica dominante retrasa la progresión de la enfermedad y parece ser una opción terapéutica potencialmente prometedora para los pacientes con CONDCA (Sanz-Gallego *et al.*, 2014). Por otro lado, estudios de nuestro laboratorio mostraron que la oleiletanolamida, un compuesto endocannabinoide, previene el daño neuronal, retrasa la muerte de las células de Purkinje y mejora el deterioro cognitivo en ratones PCD (Pérez-Martín *et al.*, 2021). Otro objetivo de los agentes neuroprotectores es la modulación de la gliosis reactiva. La respuesta glial exacerbada en el cerebelo de los ratones PCD se relaciona directamente con la rápida degeneración de las células de Purkinje (Baltanás *et al.*, 2013). Por ello, atenuar esta activación glial mediante el uso de minociclina ha demostrado retrasar la muerte de las células de Purkinje en ratones mutantes y mejorar ligeramente su rendimiento motor (Kyhrou *et al.*, 2006).

Dentro de las posibles sustancias neuroprotectoras susceptibles de ser administradas en este modelo de degeneración, destacamos la administración de factores neurotróficos.

⁶ Del inglés *Insulin-like Growth Factor I*

Este tipo de moléculas son de vital importancia por su implicación en la supervivencia, diferenciación y proliferación neuronal, tanto en el desarrollo del SNC como en la vida adulta, por lo que su administración puede considerarse como un importante enfoque terapéutico para mejorar los trastornos neurodegenerativos.

FACTORES NEUOTRÓFICOS

Los factores neurotróficos son un grupo de moléculas secretadas que desempeñan un papel crucial en el desarrollo, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células del SNC y periférico. Pueden pertenecer a varias familias moleculares diferentes, pero tienen en común que se requieren para el buen funcionamiento de las neuronas, estimulando la señalización celular y el crecimiento de axones y dendritas (Ledda y Paratcha, 2016). Es por ello que la terapia con factores neurotróficos es un área de investigación prometedora para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas más frecuentes como la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington (Sullivan y O'Keeffe, 2016). Diversos estudios recientes han demostrado que la terapia con factores neurotróficos puede mejorar la función cognitiva y motora, así como reducir la muerte celular en modelos animales de todas estas enfermedades (Fernández *et al.*, 2005; Colucci-D'Amato *et al.*, 2020). A continuación, se detallarán los factores neurotróficos más utilizados en terapias neuroprotectoras.

IGF-1

El IGF-1 es un miembro de la superfamilia de los péptidos similares a la insulina, entre los que también se encuentran la insulina, IGF-2, y siete miembros de la subfamilia de péptidos similares a la relaxina (Hudson *et al.*, 1983; Hudson *et al.*, 1984; Adham *et al.*, 1993; Chassin *et al.*, 1995; Conklin *et al.*, 1999; Lok *et al.*, 2000; Bathgate *et al.*, 2002). Se trata de un potente factor de crecimiento en el SNC, crucial para el desarrollo, la diferenciación y la proliferación de los distintos tipos neuronales, así como en su integración funcional y estructural en circuitos neuronales preexistentes, mediando cambios en la morfología, la eficacia sináptica y la organización del SNC en desarrollo (Dyer *et al.*, 2016).

El IGF-1 se produce en todos los tipos celulares del SNC, especialmente en el córtex, hipocampo, cerebelo e hipotálamo (Bach *et al.*, 1991; Bondy y Lee, 1993). La expresión del RNA mensajero (mRNA) de IGF-1 en el cerebro es relativamente baja en relación con la de su receptor (IGF1R), por lo que resulta especialmente importante el IGF-1 periférico, que

accede al SNC a través de los plexos coroideos o tras atravesar la barrera hematoencefálica (Fernández y Torres-Aleman, 2012).

La llegada de IGF-1 al SNC es dependiente de la actividad neural, siendo de vital importancia para los procesos de plasticidad celular (Carro *et al.*, 2000; Nishijima *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2013).

En cuanto a su receptor, el denominado IGF1R es una glicoproteína heterotetramérica que se expresa tanto en las células madre neurales como en todas las neuronas a lo largo de la vida (Baron-Van Evercooren *et al.*, 1991; Popken *et al.*, 2005). La activación de IGF1R da lugar a una actividad tirosin-kinasa, autofosforilación y activación de la cascada de señalización (LeRoith *et al.*, 1995). Esta activación tiene efectos importantes en el cerebro en desarrollo, en la plasticidad neuronal y en los efectos neuroprotectores ante un daño (Tabla 2).

En primer lugar, en el cerebro en desarrollo, el IGF-1 ejerce su función en todos los tipos celulares, incluyendo las células madre neurales, neuronas y células gliales (O'Kusky y Ye, 2012). Entre estas funciones destaca el aumento del tamaño cerebral (Popken *et al.*, 2005), la diferenciación de células mesenquimales en células neurales y gliales debido a sus funciones proliferativas y antiapoptóticas (Brooker *et al.*, 2000; Supeno *et al.*, 2013; Huat *et al.*, 2014), el desarrollo axonal y la formación de sinapsis (Fernández y Torres-Aleman, 2012), y en permitir la proliferación, supervivencia y migración de progenitores neurales (Tabla 2; Hurtado-Chong *et al.*, 2009; Oishi *et al.*, 2009). Por otro lado, el IGF-1 desempeña funciones esenciales en la plasticidad del SNC, como el crecimiento dendrítico (Camarero *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2003), el balance excitatorio-inhibitorio (Murillo-Cuesta *et al.*, 2011), el aumento de la densidad y estabilidad de las espinas dendríticas (Moisello *et al.*, 2008; Langlet *et al.*, 2012; Trinel *et al.*, 2013; Mysoet *et al.*, 2014; Mysoet *et al.*, 2015), o su efecto en otras células no neuronales como las células gliales (Tabla 2; Carson *et al.*, 1993; Ye *et al.*, 1995; Aberg *et al.*, 2003; Ye *et al.*, 2004; Zeger *et al.*, 2007).

Además, presenta efectos sinérgicos con otros factores neurotróficos, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF⁷; ver a continuación; McCusker *et al.*, 2006). Finalmente, el IGF-1 presenta funciones neuroprotectoras ante situaciones patológicas, entre las que destacan efectos que permiten la regeneración axonal, la astrogliosis o la remielinización (Tabla 2; McMorris *et al.*, 1993), entre otros. Por tanto, el IGF-1 es un

⁷ Del inglés *Brain Derived Neurotrophic Factor*

factor neurotrófico con amplias funciones en el SNC, lo que le hace ser un buen candidato para un tratamiento farmacológico.

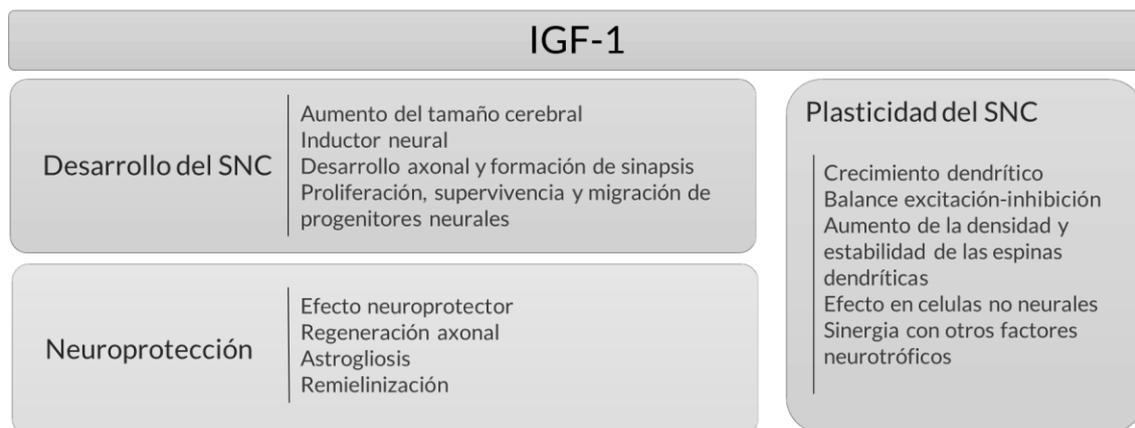


Tabla 1. Resumen de las funciones de IGF-1 en el desarrollo y plasticidad del SNC en condiciones normales y patológicas.

BDNF

El BDNF es un miembro de la familia de las neurotrofinas, en la que se incluyen el factor de crecimiento nervioso, la neurotrofina 3 y la neurotrofina 4 (Hohn *et al.*, 1990; Maisonpierre *et al.*, 1990; Rosenthal *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1992). Se produce principalmente en las neuronas y células gliales, con una acción pleiotrópica en el SNC (Lessmann y Brigadski, 2009). Cada vez hay más estudios que indican que BDNF participa en un amplio espectro de procesos neurofisiológicos debido a su patrón característico de síntesis, que implica varias isoformas biológicamente activas que interactúan con diferentes receptores, y controlan así numerosas vías de señalización (Kowianski *et al.*, 2018).

El BDNF está presente en casi todas las regiones encefálicas (Hofer *et al.*, 1990; Yan *et al.*, 1997). Su función depende tanto de la fase de desarrollo del encéfalo como de la región neuronal, glial o vascular del tejido nervioso (Kowianski *et al.*, 2018).

Las funciones más importantes de BDNF incluyen los procesos de desarrollo, la regulación de la neurogénesis, la neuroprotección y el control de las interacciones sinápticas de corta y larga duración que influyen en los mecanismos de la memoria y la cognición (Tabla 3; Park y Poo, 2013; Foltran y Diaz, 2016; González *et al.*, 2016; Sasi *et al.*, 2017).

Comenzando con sus funciones durante el desarrollo, BDNF estimula la gliogénesis y la proliferación glial durante el desarrollo encefálico y en algunos procesos patológicos (Frisen *et al.*, 1993). Durante la embriogénesis, BDNF permite la diferenciación de

progenitores corticales y, posteriormente, promueve la diferenciación de estos a neuronas (Bartkowska *et al.*, 2007).

Además, produce la regulación de la síntesis proteica y el desarrollo del citoesqueleto, y aumenta el crecimiento y la arborización dendrítica (Tabla 3; Jaworski *et al.*, 2005; Kumar *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha relacionado BDNF con la neurogénesis adulta, pero su función en el mantenimiento de un número adecuado de progenitores neurales y las condiciones que permiten su crecimiento y desarrollo no está demostrado, y los datos suelen ser contradictorios. Por tanto, actualmente se trata a BDNF como un factor diferenciador más que como un factor de supervivencia (Kowianski *et al.*, 2018). De hecho, cada vez hay más estudios que señalan la acción de BDNF durante las últimas fases de la neurogénesis (Bergami *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2015), ya que estimula la diferenciación neuronal, así como la morfogénesis y arborización dendrítica (Tabla 3; Gao *et al.*, 2009; Rauskolb *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2015).

El papel de BDNF en la regulación de la plasticidad sináptica se ha estudiado durante años tanto *in vivo* como *in vitro*. BDNF influye en varios aspectos funcionales y estructurales de la transmisión sináptica y permite una mayor eficacia de la transferencia de señales (Lynch, 2004). Esta neurotrofina actúa tanto en el compartimento presináptico como en el postsináptico, modula la eficacia sináptica, ya sea modificando la liberación del transmisor o incrementando la sensibilidad de su recepción (Itami *et al.*, 2003; Edelman *et al.*, 2014). Además, BDNF estimula la arborización y formación de espinas dendríticas (Kato-Semba *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2019), y la expresión de genes relacionados con la función vesicular y la comunicación sináptica (Mariga *et al.*, 2015).

Finalmente, BDNF regula la síntesis local de proteínas y provoca una modulación rápida y sutil del proteoma para remodelar las regiones sinápticas en respuesta a estímulos (Tabla 3; Eyman *et al.*, 2013). Por tanto, BDNF puede actuar como mediador, modulador o instructor de la plasticidad sináptica.

En cuanto a los efectos neuroprotectores, estos se basan principalmente en su efecto sobre la neurogénesis (descrita anteriormente) y sobre su actividad antiapoptótica y antioxidante (Zuccato y Cattaneo, 2009). BDNF promueve la expresión de proteínas que producen resistencia neuronal contra el estrés oxidativo y la muerte celular programada (Tabla 3; Chen *et al.*, 2017), lo que hacen de BDNF un buen candidato para una terapia neuroprotectora.

BDNF	
Desarrollo del SNC	Inductor de la producción glial Proliferación y diferenciación de progenitores neurales Desarrollo del citoesqueleto Crecimiento y arborización dendrítica
Neurogénesis	Factor diferenciador Diferenciación neuronal y arborización dendrítica
Plasticidad sináptica	Regulación de los transmisores pre y post sinápticos Arborización y formación de espinas dendríticas Función vesicular y comunicación sináptica
Neuroprotección	Aumento de la neurogénesis Actividad anti-apoptótica y antioxidante

Tabla 3. Resumen de las funciones de BDNF en el desarrollo, plasticidad sináptica, neurogénesis y neuroprotección.

VEGF-A

El factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGF-A⁸) es el principal factor de crecimiento específico de las células endoteliales. Pertenece a la superfamilia VEGF/PDGF⁹, entre las que se incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, svVEGF¹⁰ y PlGF¹¹. VEGF-A se produce en órganos como el encéfalo, hígado, bazo, riñón y piel gracias a varios tipos celulares como las células endoteliales, los macrófagos y las células T activadas, entre otros (Freeman *et al.*, 1995; Ferrara y Davis-Smyth, 1997; Melder *et al.*, 2000).

La expresión de VEGF-A está regulada por una variedad de estímulos, como la hipoxia, factores de crecimiento, la hormona estimulante de la tiroides, promotores de tumores y óxido nítrico (Takahashi y Shibuya, 2005).

Es esencial para muchos procesos angiogénicos que ocurren tanto en estados fisiológicos como patológicos, tales como la vascularización tumoral. Estos efectos ocurren gracias a su interacción con dos receptores tirosina quinasas denominados VEGFR1 y VEGFR2 (Shibuya *et al.*, 1990; Matthews *et al.*, 1991; Terman *et al.*, 1991).

⁸ Del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor A*

⁹ Del inglés *Platelet-Derived Growth Factor* o factor de crecimiento derivado de las plaquetas

¹⁰ Del inglés *Snake Venom VEGF* o VEGF de veneno de serpiente

¹¹ Del inglés *Placenta Growth Factor* o factor de crecimiento placentario

En primer lugar, VEGF-A es una molécula clave en la regulación de las células endoteliales: promueve su proliferación, migración y supervivencia –es decir, la angiogénesis–, así como la permeabilidad vascular (Ferrara *et al.*, 2004). Por otro lado, también se le atribuyen efectos neuroprotectores (Tabla 4).

En cuanto a su función angiogénica, es de vital importancia la regulación precisa de VEGF-A durante la embriogénesis. De esta manera, durante el desarrollo, la expresión reducida de este factor neurotrófico puede provocar defectos significativos en la vasculatura de varios órganos, así como un número notablemente reducido de glóbulos rojos. Sin embargo, un aumento de expresión puede provocar retrasos en el desarrollo del corazón (Miquerol *et al.*, 2000). Por tanto, es importante para el crecimiento de células endoteliales, hematopoyesis y formación y organización de vasos sanguíneos (Tabla 4; Hiratsuka *et al.*, 1998). Por otro lado, aumenta la permeabilidad vascular (Bates y Harper, 2002) mediante la activación de VEGFR2 en las células endoteliales. Así, VEGF-A induce la fenestración endotelial y aumenta la desorganización de las proteínas de unión endotelial (Tabla 4; Kevil *et al.*, 1998).

Finalmente, estudios recientes muestran que VEGF-A afecta directamente a las neuronas. En particular, VEGF-A es un factor clave en el SNC tanto en desarrollo como adulto. Este factor neurotrófico actúa promoviendo el crecimiento axonal, así como la diferenciación, migración y supervivencia neuronal (Oosthuysen *et al.*, 2001; Storkebaum *et al.*, 2004). Además, VEGF-A actúa como mediador de la apoptosis induciendo proteínas antiapoptóticas e inhibiendo las proapoptóticas (Tabla 4; Góra-Kupilas y Josko, 2005).

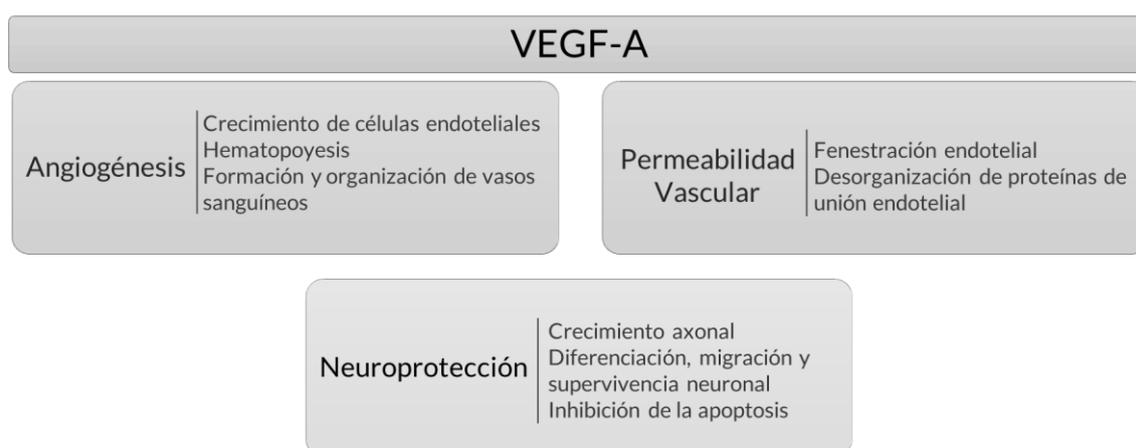


Tabla 4. Resumen de las funciones de VEGF-A en los procesos de angiogénesis y permeabilidad vascular.

VEGF-B

Como se ha mencionado anteriormente, el VEGF-B es otro miembro de la superfamilia VEGF/PDGF. VEGF-B tiene una amplia distribución, siendo más abundante en tejidos con alta actividad metabólica como músculo cardíaco, músculo esquelético, músculo liso vascular, tejido adiposo pardo, cerebro, riñón y las células parietales del estómago (Olofsson *et al.*, 1996; Aase *et al.*, 1999; Capoccia *et al.*, 2009; Bry *et al.*, 2014). Ello sugiere que VEGF-B desempeña un papel fundamental en la coordinación de la interacción entre angiogénesis y metabolismo.

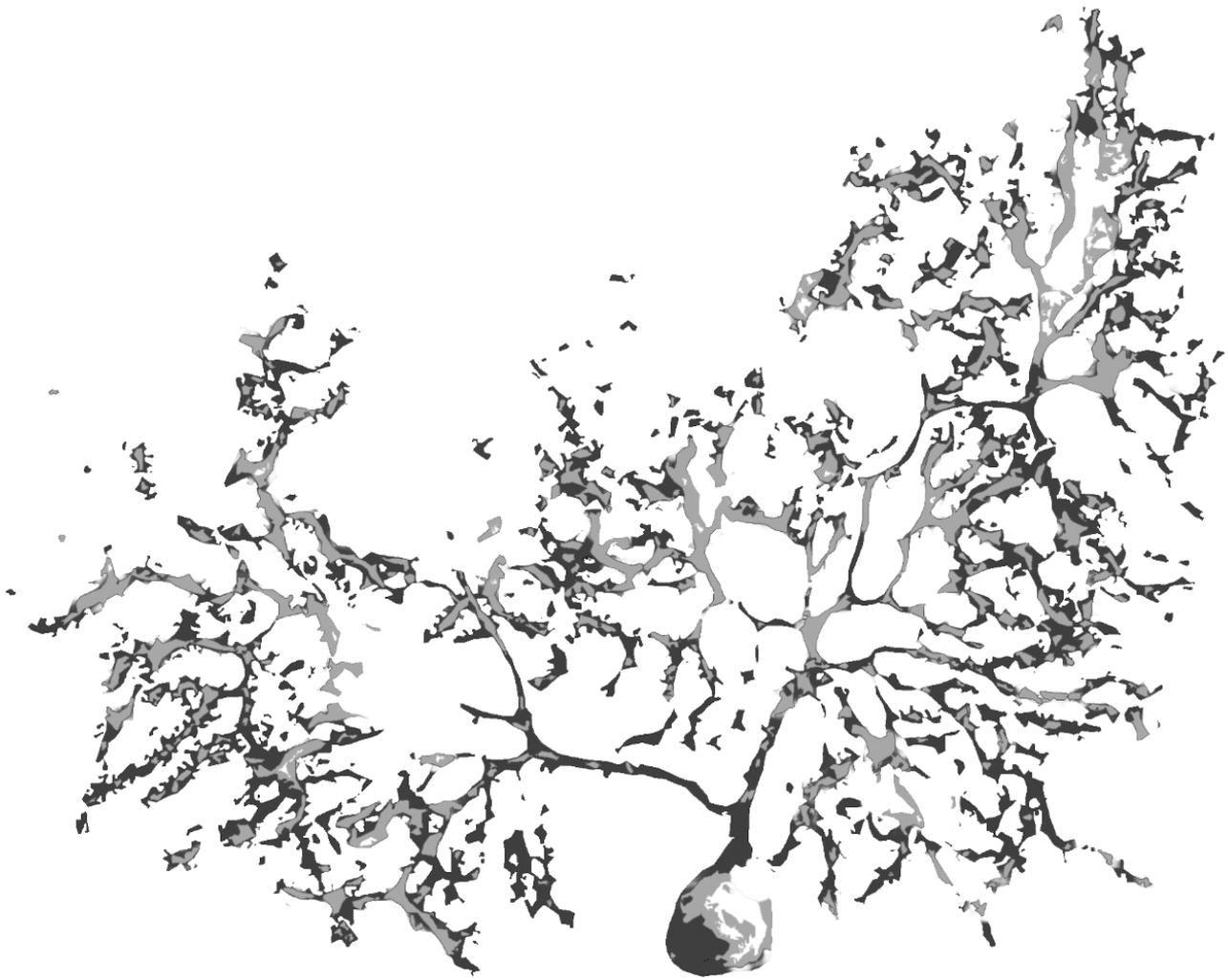
A diferencia de otros miembros de la familia VEGF, este factor neurotrófico carece de actividad angiogénica general, siendo sus funciones prácticamente neuroprotectoras y metabólicas, por lo que tiene un papel notorio en el SNC (Tabla 5). Estos efectos se deben a que VEGF-B solo se une al receptor VEGFR1 (Bry *et al.*, 2014).

Los efectos neuroprotectores de VEGF-B se producen debido a su expresión en las neuronas del SNC (Aase *et al.*, 1999; Dhondt *et al.*, 2011), donde estimula la neurogénesis adulta (Sun *et al.*, 2006) y protege a las neuronas, lo que permite su supervivencia en enfermedades como el Parkinson o la ELA (Poesen *et al.*, 2008; Falk *et al.*, 2009). Esta neuroprotección parece estar relacionada con la regulación de la apoptosis, ya que VEGF-B inhibe la expresión de genes que codifican las proteínas proapoptóticas, así como los de miembros de la familia de las caspasas (Tabla 5; X. Li *et al.*, 2008).

Por otro lado, se ha relacionado a VEGF-B con el correcto funcionamiento mitocondrial. La expresión de VEGF-B y de varios genes y proteínas mitocondriales está regulada de forma coordinada, siendo el único miembro de la familia VEGF con esta característica (Mootha *et al.*, 2003; Hagberg *et al.*, 2010). Además, como se ha mencionado anteriormente, VEGF-B regula, a través de su receptor VEGFR1, la expresión de genes relacionados con la vía mitocondrial de la apoptosis (X. Li *et al.*, 2008). Por otro lado, VEGF-B permite el transporte de ácidos grasos a la mitocondria (Hagberg *et al.*, 2010), normaliza el potencial de membrana mitocondrial (Dhondt *et al.*, 2011) y aumenta los niveles de ATP (Yue *et al.*, 2014). Por tanto, VEGF-B mediante su unión al receptor VEGFR1 potencia los procesos de protección durante el estrés celular (Tabla 5; Falk *et al.*, 2010; Olsson *et al.*, 2006).

VEGF-B	
Neuroprotección	<ul style="list-style-type: none"> Ausencia de efecto angiogénico Estimulación de la neurogénesis adulta Regulación de la apoptosis
Efecto en la mitocondria	<ul style="list-style-type: none"> Regulación de la apoptosis Transporte de AG a la mitocondria Normaliza el PMM Aumenta los niveles de ATP Protección frente a estrés celular

Tabla 5. Resumen de las funciones de VEGF-B en los procesos de neuroproteccion y de mantenimiento de la calidad mitocondrial. AG, ácidos grasos; PMM: potencial de membrana mitocondrial



JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las enfermedades neurodegenerativas son patologías del SNC o periférico que se caracterizan por la pérdida progresiva de elementos neurales. La búsqueda de nuevas terapias que puedan frenar o paliar el proceso de muerte celular que acompaña a estas enfermedades es un desafío que la comunidad científica ha afrontado en las últimas décadas. A pesar de que en la actualidad existen medicamentos que alivian los síntomas, todavía no se ha encontrado un tratamiento que sea realmente eficaz para detener o frenar la progresión de estas graves afecciones. Cada vez hay más estudios que proponen las terapias con factores neurotróficos como las más prometedoras para conseguir tal deseada paliación, por su papel en el desarrollo, diferenciación, proliferación y supervivencia de las células nerviosas. En este sentido, la investigación con modelos animales de enfermedades neurodegenerativas juega un papel fundamental en el diseño de nuevos tratamientos y la evaluación de su eficacia en estudios preclínicos.

En la presente Tesis Doctoral usaremos el ratón PCD, modelo directo de la patología humana CONDCA que, además de presentar una gran utilidad para estudiar diferentes procesos de degeneración neuronal selectiva, sirve para evaluar diferentes tratamientos farmacológicos. La degeneración rápida y selectiva de las células de Purkinje del cerebelo de este ratón permite estudiar cómo el deterioro progresivo puede afectar al comportamiento motor, cognitivo y social, y cómo podemos, en su caso, evitar esta disfunción tras un tratamiento farmacológico.

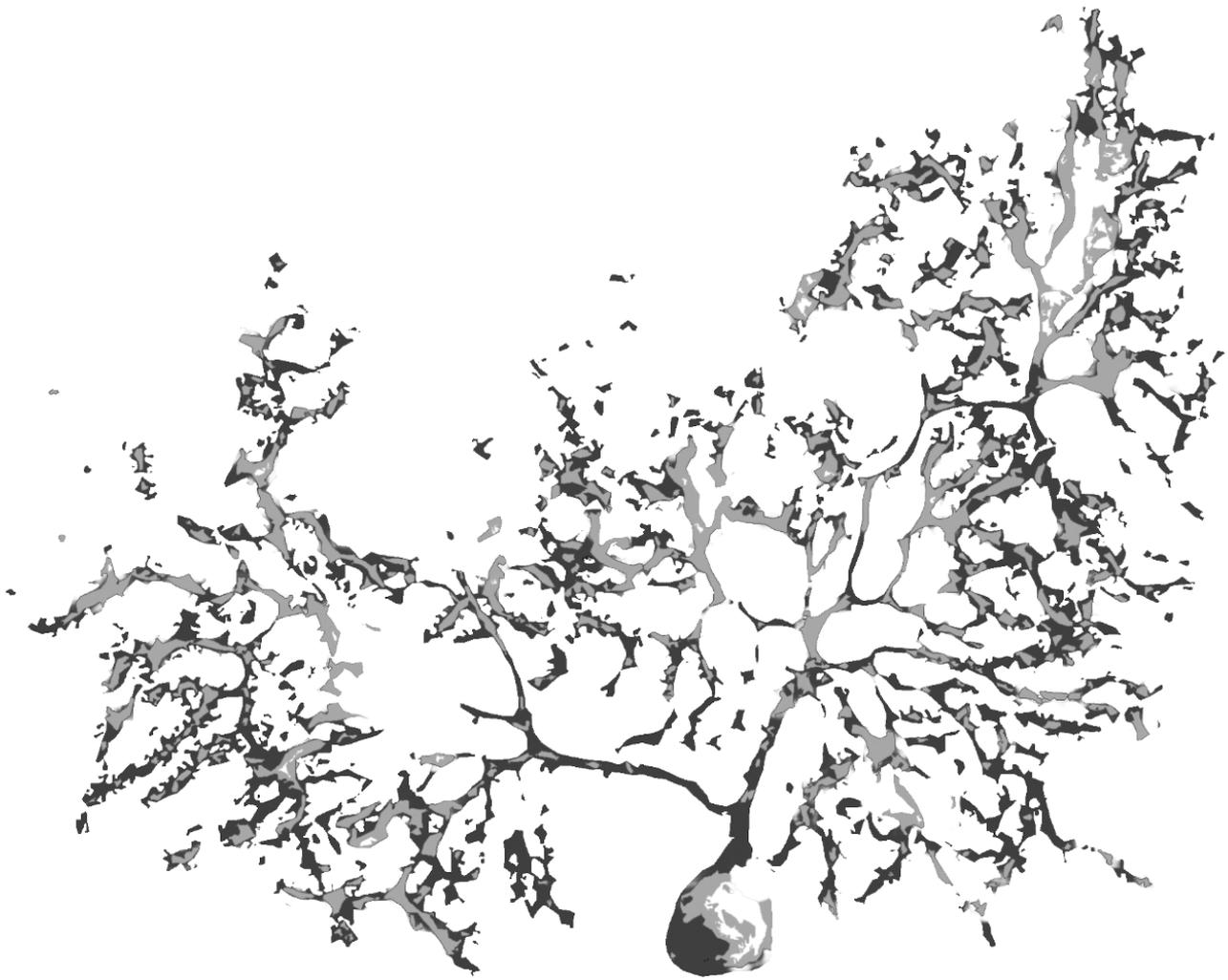
Por lo tanto, la **hipótesis** de la presente Tesis Doctoral es que *el tratamiento con factores neurotróficos tiene efectos neuroprotectores en el modelo PCD de degeneración neuronal selectiva.*

Para comprobar dicha hipótesis, se han desarrollado los siguientes **objetivos** generales y específicos (nótese la asimetría en los mismos debido a una progresión diferente en el trabajo, según los resultados obtenidos).

- I. Analizar el patrón de expresión en el ratón PCD de los factores neurotróficos más relevantes en el desarrollo, crecimiento, proliferación celular, en comparación con animales control.
 - a. Analizar las fluctuaciones génicas de *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* y *Vegf-B* a lo largo del proceso neurodegenerativo del cerebelo del ratón PCD.
 - b. Confirmar la relevancia de la expresión génica anterior mediante el estudio de la expresión proteica de los factores neurotróficos mencionados en el objetivo específico anterior.

- II. Analizar el efecto neuroprotector de rhIGF-1
 - a. Administrar rhIGF-1 en función de sus fluctuaciones a lo largo de proceso degenerativo del cerebelo en el ratón PCD.
 - b. Examinar su efecto sobre las funciones motoras, cognitivas y sociales de los animales PCD a lo largo de dicho proceso neurodegenerativo.
 - c. Analizar el efecto protector sobre poblaciones celulares identificadas en el cerebelo del ratón PCD.

- III. Analizar el efecto neuroprotector del tratamiento con rhVEGF-B
 - a. Administrar rhVEGF-B a lo largo del proceso degenerativo del cerebelo en el ratón PCD.
 - b. Analizar el efecto del tratamiento óptimo con rhVEGF-B sobre las funciones motoras, cognitivas y sociales en paralelo con dicho proceso neurodegenerativo.
 - c. Estudiar el efecto del tratamiento con rhVEGF-B sobre poblaciones celulares definidas en el cerebelo de ratones PCD.
 - d. Examinar el músculo esquelético para ver posibles alteraciones tras el tratamiento con rhVEGF-B.
 - e. Estudiar el comienzo la disfunción mitocondrial que se asocia con la mutación *pcd* y analizar el efecto del tratamiento con rhVEGF-B sobre dicha calidad mitocondrial.



MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

En la presente Tesis Doctoral se emplearon ratones (*Mus musculus* L. 1758, Muridae, Rodentia, Mammalia) silvestres (WT¹²) y mutantes PCD de la estirpe C57BL/DBA de diferentes edades y sexos. Esta estirpe híbrida se obtuvo mediante el cruce entre animales C57BL/6J y DBA/2J procedentes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, MA, EE. UU.).

Los animales se criaron y mantuvieron en el animalario del Instituto de Neurociencias de Castilla y León y en el animalario de Organismos Modificados Genéticamente del Centro de Investigación del Cáncer, ambos pertenecientes al Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca. Los animales se alojaron a temperatura y humedad constantes, con un fotoperiodo artificial de 12/12 horas, y se alimentaron *ad libitum* con agua y pienso compuesto para roedores (Tecklad Global Diet, Envigo, IN, EE. UU.). Debido a las necesidades especiales de los animales mutantes, a partir de la edad de destete (P21), la dieta se suplementó con agar gelatinizado al 3% (p/v, Panreac-AppliChem, Castellar del Vallès, España).

Todos los procedimientos de la presente Tesis Doctoral se realizaron en cumplimiento con la normativa europea (Directiva 2010/63/UE) y española (RD118/2021 y Ley 32/2007) vigentes para el uso y cuidado de animales de experimentación, y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (Referencia #613).

Colonia PCD

Los animales PCD usados en este estudio portan la mutación original *pcd^{fl}*, que fue transferida a la estirpe C57BL/6J en 1976 (Mullen *et al.*, 1976). La estirpe híbrida usada en esta Tesis Doctoral se consiguió mediante el cruce de ratones macho de la estirpe C57BL/6J heterocigotos para la mutación *pcd^{fl}* con hembras silvestres de la estirpe DBA/2J. De esta manera se consiguió asociar el alelo *pcd^{fl}* al trasfondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo silvestre quedó asociado al trasfondo genético del cromosoma 13 de la estirpe DBA/2J. Debido a las pésimas características reproductivas de los animales homocigotos para la mutación (*pcd/pcd*), el mantenimiento de la colonia se llevó a cabo mediante cruces entre individuos heterocigotos (+/*pcd*).

¹² Del inglés *Wild-type*

Puesto que en edades tempranas previas a la neurodegeneración los animales WT (+/+), heterocigotos (+/*pcd*) y mutantes (*pcd/pcd*) son fenotípicamente indistinguibles, es necesario realizar la tipificación genética mediante el uso de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR¹³; ver a continuación).

Genotipado de animales

Extracción de DNA

Los animales se marcaron mediante la perforación de una oreja entre P6-P8, momento que se aprovechó para la toma de una muestra de tejido. Se recogió el pequeño fragmento de oreja procedente de dicha perforación, y en aquellos animales sin marcar se cortó el extremo de su cola (alrededor de 1 mm) como muestra. Con este tejido, llevamos a cabo el aislamiento del DNA genómico. Para ello, el tejido se homogeneizó y lisó durante al menos tres horas a 55 °C en un tampón que contenía: proteinasa K 6 U/ml (Sigma-Aldrich, MO, EE. UU.), dodecil sulfato sódico (SDS¹⁴; Sigma-Aldrich) 0,2% (p/v), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA¹⁵; Sigma-Aldrich) 5mM pH 8,0, tampón Tris 0,1 M pH 8,0, NaCl 200mM (Sigma-Aldrich), todo ello diluido en agua Elix.

El homogeneizado se resuspendió y centrifugó durante 2 minutos a 13.200 revoluciones por minuto (r.p.m.) a temperatura ambiente empleando una centrífuga 5415D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) y se recogió el sobrenadante que contenía el DNA. A continuación, se añadió un volumen equivalente de isopropanol (Prolabo, Fontenay-Sous-Bois, Francia) para precipitar el DNA y se centrifugó de nuevo durante 10 minutos. Finalmente, el precipitado de DNA se lavó con etanol 70% (v/v, VWR Chemicals, OH, EE. UU.), se centrifugó de nuevo durante 10 minutos, se dejó secar y se resuspendió con agua Elix en el volumen adecuado para cada muestra (entre 20 y 100 µl).

Amplificación del DNA mediante PCR

La mutación *pcd^{fl}* se encuentra en una región reguladora que hasta ahora no ha sido identificada, por lo que para la identificación genotípica de los animales se recurrió al uso de microsatélites, nucleótidos repetidos en tándem muy polimórficos, utilizados como marcadores moleculares intraespecíficos.

¹³ Del inglés *polymerase chain reaction*

¹⁴ Del inglés *sodium dodecyl sulphate*

¹⁵ Del inglés *ethylenediaminetetraacetic acid*

Se analizaron dos microsatélites presentes tanto en la estirpe C57BL/6J –portadora de la mutación–, como en la estirpe DBA/2J: D13Mit250 y D13Mit283. La elección de estos microsatélites se debe principalmente a dos características. La primera es que ambos están localizados próximos a la región portadora de la mutación *pcd^{fJ}*, por lo que aseguramos su transmisión ligada con una alta probabilidad. Además, estos microsatélites son distintos entre ambas estirpes, ya que su tamaño en número de pares de bases (pb) es diferente, lo que permite diferenciar los alelos *pcd^{fJ}* y WT al separar mediante electroforesis el producto obtenido tras la PCR.

Por tanto, mediante la técnica de la PCR se amplificaron los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283. El medio para realizar la PCR contiene tampón comercial de la polimerasa Taq 1X (Promega, WI, EE. UU.), Taq polimerasa 0,125 U/μl (Promega), dimetilsulfóxido 5% (v/v), MgCl₂ 1,5 mM, cebadores o *primers* 2,5 μM (Tabla 6), DNA (100-500 ng) y agua Elix.

Microsatélite	Sentido	Antisentido
D13Mit250	ACACTCATTTCATGCACGA	AGGTCCTCAAATCTCACAAGTAGG
D13Mit283	GGAAGCAGTCTCCTGCCTC	GAGAGGTGGCACATGAGGTT

Tabla 6. Secuencias sentido y antisentido de los *primers* empleadas para la amplificación de los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283.

Como control positivo incluimos una muestra de DNA de cada uno de los genotipos posibles (+/+, +/*pcd*, *pcd/pcd*) y como control negativo usamos el medio descrito anteriormente, sustituyendo la cantidad de DNA por agua Elix.

La PCR se realizó usando las condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos detalladas en la Tabla 7 usando el termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycle (Applied Biosystems, CA, EE. UU.).

Ciclo	Fase	T ^a D13Mit250	T ^a D13Mit283	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	94 °C	5 min
2	Desnaturalización	94 °C	94 °C	1 min
3	Alineamiento	54 °C x40	54 °C x40	1 min
4	Elongación	72 °C	72 °C	1 min 30 s
5	Elongación final	72 °C	72 °C	10 min
6	Conservación	4 °C	4 °C	∞

Tabla 7. Condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos de la PCR para el genotipado de la mutación *pcd^{fJ}*.

Identificación de los productos de la PCR

Como se indicó en el apartado anterior, los microsatélites utilizados para amplificar mediante la PCR –D13Mit250 y D13Mit283– presentan diferencias en el número de pares de bases en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J. En el caso del microsatélite D13Mit250, el producto de la PCR es un fragmento de 130 pb en los ratones de la estirpe C57BL/6J, mientras que en la estirpe DBA/2J es de 116 pb. A su vez, el producto de la PCR del microsatélite D13Mit283 en la estirpe C57BL/6J es de 114 pb, mientras que en la estirpe DBA/2J es de 136 pb (Figura 5).

La separación mediante electroforesis se realiza en un gel de agarosa para fragmentos de DNA de pequeño tamaño (MS-8, Condalab, Madrid, España) al 3% (p/v) en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x, al que se le añade 0,1 µl/ml de RedSafe (Intron Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur), un agente intercalante del DNA que permite visualizar las bandas de DNA amplificado con ayuda de una lámpara ultravioleta (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.). Dejamos correr el gel durante 20 minutos a un voltaje de 100-110 V.

La diferencia en el número de bases dependiendo de la estirpe permite tipificar el genotipo de los animales. De esta forma, si tras la electroforesis encontramos una sola banda de 130 pb para D13Mit250 o de 114 pb para D13Mit283, se trata de animales homocigotos para la mutación *pcd^{fl}* (*pcd/pcd*). Si encontramos una única banda de 116 pb para D13Mit250 o una banda de 136 pb para D13Mit283, corresponde con animales homocigotos WT (+/+). Por último, si encontramos dos bandas de diferente tamaño, 130 y 116 pb para D13Mit250, o bien, 114 y 136 pb para D13Mit283, éstas se corresponden con animales heterocigotos (+/*pcd*), Figura 5).

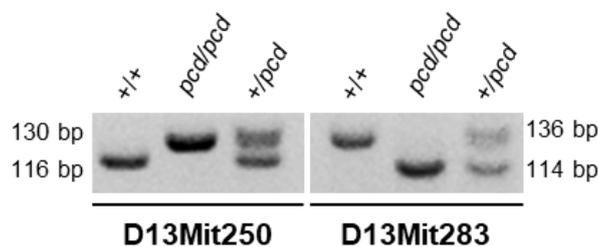


Figura 5. Resultado de la electroforesis del genotipado de la mutación *pcd^{fl}*. Las bandas corresponden a animales homocigotos WT (+/+) y PCD (*pcd/pcd*), y las bandas dobles a animales heterocigotos (+/*pcd*).

DISEÑO EXPERIMENTAL GENERAL

En esta Tesis Doctoral se ha realizado un gran número de técnicas, en muchos casos similares en los distintos bloques de experimentos, a pesar de que los objetivos de éstos fuesen diferentes. Además, siempre con el objetivo de reducir en lo posible el número de animales de experimentación, se aprovechó el tejido de un mismo ratón para experimentos diferentes. Por ello, para evitar la redundancia y para una mejor comprensión, en este apartado inicial se explicará el diseño experimental global de toda la tesis (Tabla 8). Más adelante, se irá detallando cada técnica usada de forma específica.

El propósito general de la presente Tesis Doctoral es la búsqueda de nuevos fármacos que eviten o frenen la muerte neuronal. Por ello, en primer lugar, se llevó a cabo un *screening* en el que analizamos cuatro factores neurotróficos en el cerebelo de ratones WT y PCD: IGF-1, BDNF, VEGF-A y VEGF-B. Este *screening* se llevó a cabo mediante el uso de la PCR cuantitativa (qPCR¹⁶) –para el análisis de la expresión génica– y de ELISA¹⁷ –para el análisis de la producción proteica–. El resultado de este estudio preliminar nos permitió diseñar un tratamiento farmacológico con las proteínas recombinantes humanas de los factores neurotróficos que se encuentran alterados en el ratón mutante PCD (Figura 6) que, como veremos, son IGF-1 (rhIGF-1¹⁸) y VEGF-B (rhVEGF-B¹⁹). Además, en el caso del tratamiento con rhVEGF-B, nuestros resultados nos llevaron a probar dos pautas de administración, bien de forma diaria o bien cada dos días.

De forma general, el efecto de ambos tratamientos se analizó mediante pruebas de comportamiento y recuento de células de Purkinje en el cerebelo (Figura 6). Sin embargo, la mejora de estos dos parámetros tras el tratamiento con rhVEGF-B administrado cada dos días, nos llevó a analizar otros aspectos del efecto neuroprotector (Figura 6 B).

En primer lugar, llevamos a cabo el análisis de la muerte celular programada o apoptosis, para comprobar el estado de las neuronas supervivientes. Además, analizamos el estado del músculo esquelético, dadas las mejoras en el comportamiento motor.

¹⁶ Del inglés *quantitative Polymerase Chain Reaction*

¹⁷ Del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

¹⁸ Del inglés *Recombinant Human IGF-1*

¹⁹ Del inglés *Recombinant Human VEGF-B*

Por otro lado, puesto que el ratón mutante PCD sufre una disfunción mitocondrial, quisimos determinar varios parámetros relacionados con la calidad de estos orgánulos. Estos análisis se llevaron a cabo mediante el estudio de variables mitocondriales que se encuentran alteradas comúnmente en los procesos neurodegenerativos, implicados en la capacidad respiratoria y la respuesta al estrés celular por parte de la mitocondria. Dichos análisis se realizaron antes y durante el proceso neurodegenerativo, lo que nos aporta información de si existe un daño mitocondrial previo al comienzo de la neurodegeneración, y cómo avanza con la muerte neuronal. Por otro lado, analizamos la calidad mitocondrial en los ratones tratados con rhVEGF-B, para comprobar si la mejora en el comportamiento y en la densidad celular se debía a una mejora en la calidad mitocondrial. Todos los experimentos relacionados con la mitocondria se llevaron a cabo en colaboración con la Dra. Elisa Motori, en una estancia realizada en la Universidad de Colonia (Alemania).

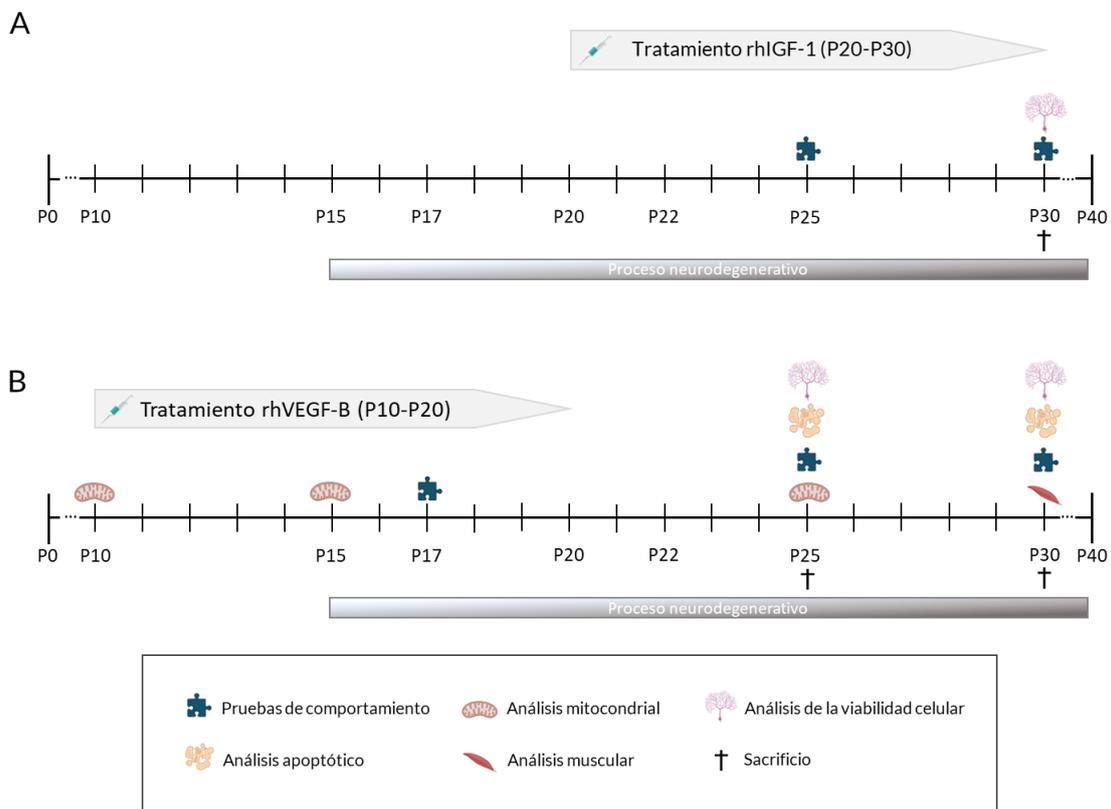


Figura 6. Líneas temporales del tratamiento con rhIGF-1 y rhVEGF-B. (A) En el tratamiento con rhIGF-1 se llevaron a cabo pruebas de comportamiento a P25 y P30, momento del sacrificio, en el que se analizó la viabilidad de células de Purkinje. **(B)** En el tratamiento con rhVEGF-B se realizaron varios análisis: pruebas de comportamiento a P17, P25 y P30, análisis de la supervivencia y apoptosis de células de Purkinje a P25 y P30, análisis del músculo esquelético a P30 y de la calidad mitocondrial a P10, P15 y P25. Nótese que para este tratamiento se probaron dos pautas de administración: continua y cada dos días (no mostradas en la imagen).

Objetivos		Experimentos	Grupo experimental	Edad	n	
Screening	<i>Screening</i> de los factores neurotróficos	Análisis génicos mediante qPCR	WT	P10-P40	6	
			PCD		6	
		Análisis proteicos mediante ELISA	WT	P15, P20	6	
			PCD	P25, P40	6	
Tratamiento con factores neurotróficos	rhIGF-1	Pruebas de comportamiento motor, cognitivo y social	WT	P25	12	
			PCD		12	
			PCD + rhIGF-1		P30	12
			PCD + NaCl		6	
		Análisis de la supervivencia celular	WT	P30	8	
			PCD		8	
			PCD + rhIGF-1		8	
			PCD + NaCl		6	
	rhVEGF-B administrado cada dos días	Pruebas de comportamiento motor, afectivo y social	WT	P17	12	
			PCD	P25	12	
			PCD + rhVEGF-B	P30	12	
			PCD + NaCl	6		
		Análisis de la supervivencia celular	WT	P25	8	
			PCD		8	
			PCD + rhVEGF-B		P30	8
			PCD + NaCl		6	
	Análisis de la muerte celular programada o apoptosis	WT	P25	8		
		PCD		8		
		PCD + rhVEGF-B		P30	8	
rhVEGF-B administrado diariamente	Pruebas de comportamiento	WT	P17	5		
		PCD	P25	5		
		PCD + NaCl	P30	5		
		PCD + rhVEGF-B	5			
		Análisis histológicos	P30	5		
Análisis avanzado del efecto neuroprotector de VEGF-B	Músculo esquelético	WT	P30	6		
		PCD		6		
		PCD + rhVEGF-B		6		
	Mitocondria	Análisis de parámetros mitocondriales alterados	WT	P10, P15	4	
			PCD	P25	4	
		Efectividad del tratamiento con rhVEGF-B en la mitocondria	WT	P25	4	
			PCD		4	
	PCD + rhVEGF-B	4				

Tabla 8. Diseño experimental general de la presente Tesis Doctoral.

ANÁLISIS GÉNICO

La búsqueda de alteraciones en los niveles de expresión de factores neurotróficos en el ratón PCD que pudiesen dar lugar a nuevas estrategias farmacológicas se llevó a cabo mediante el análisis de cambios en la expresión génica usando la técnica de la qPCR. Los genes analizados fueron *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* y *Vegf-B*. Estos experimentos se realizaron en ratones WT y PCD a lo largo de todo el proceso neurodegenerativo, desde P10, –momento en el que no observamos degeneración en el ratón mutante PCD–, hasta P40 –cuando la neurodegeneración es completa y únicamente encontramos células de Purkinje aisladas (Wang y Morgan, 2007)–.

Extracción de muestras en fresco

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y decapitación. Después, se extrajo cuidadosamente el encéfalo y se diseccionó el cerebelo, seccionándolo a su vez por la línea media sagital, para obtener y procesar por separado los dos hemisferios cerebelosos con su correspondiente área del vermis, tal como se muestra en la Figura 7. El hemisferio izquierdo se usó para realizar los análisis génicos usando la técnica qPCR, mientras que el derecho se utilizó para los análisis proteicos mediante ELISA. Todo el proceso se realizó manteniendo el tejido en solución salina estéril, y se empleó material quirúrgico previamente lavado y calentado a 230 °C durante 1 hora para desnaturalizar las ribonucleasas. Tras la disección, el tejido se congeló por separado usando nitrógeno líquido y los distintos bloques se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

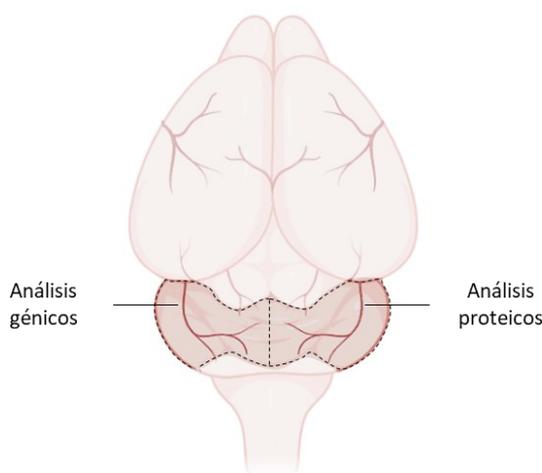


Figura 7. Representación gráfica de un encéfalo de ratón visto dorsalmente. La línea de puntos indica la región específica del cerebelo que se usó para los análisis moleculares, tanto génicos como proteicos. Imagen modificada de BioRender.

Extracción del RNA total

El análisis génico se realizó mediante la detección de cambios en la cantidad de mRNA de los genes de interés. Para ello, se aisló y purificó el RNA total de la mitad izquierda del cerebelo usando el kit comercial de extracción por columnas PureLink RNA Mini Kit y PureLink DNase Set (Invitrogen, MA, EE. UU.). En primer lugar, cada muestra se lisó en 600 μ l de tampón de lisis con 1 % (v/v) de β -mercaptoetanol (Bio-Rad Laboratories) –usado para eliminar las ribonucleasas liberadas durante la lisis–, y se disgregó con un homogeneizador Ultra Turrax T-10 Basic (IKA, Staufen, Alemania). A continuación, el homogeneizado se pasó por una jeringa de insulina (0,5 ml, 30 G x 0,3 x 8 mm) y, una vez comprobado el correcto homogeneizado de la muestra, se continuó con el protocolo especificado en el kit comercial. Tras varios lavados y tratamientos con DNAsas, la cantidad y calidad del RNA total extraído se cuantificó con un nanoespectrofotómetro UV/Vis P-Class (Implen, Múnich, Alemania). El espectrofotómetro mide la concentración de la muestra utilizando diferentes frecuencias de onda (260 y 280 nm), por lo que, al tratarse de RNA, debemos asegurarnos de que la relación entre estas dos se encuentre cercana a 2, ya que alteraciones en este valor indican la presencia de contaminación. Tras esta comprobación, el RNA se almacenó a -80°C hasta el siguiente paso, la obtención de DNA complementario (cDNA) mediante la retrotranscripción.

Obtención del DNA complementario

Una vez obtenido el RNA total de todas las muestras y grupos experimentales, llevamos a cabo la retrotranscripción o transcripción reversa, mediante la cual obtenemos cadenas de cDNA a partir de las moléculas de mRNA presentes. Este proceso implica el uso de una retrotranscriptasa capaz de polimerizar una cadena de cDNA a partir de RNA monocatenario como molde.

Para ello usamos el kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). El medio usado para la retrotranscripción contenía: tampón comercial de la transcriptasa reversa 2X, *primers* o cebadores aleatorios de retrotranscripción 2X, desoxinucleótidos trifosfato 8mM, 1000 ng de RNA y agua Milli-Q libre de enzimas RNAsas. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) programado con las condiciones de amplificación que se especifican en la Tabla 9. Una vez realizado este proceso, el cDNA se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ciclo	Temperatura	Tiempo
1	25 °C	10 min
2	37 °C	120 min
3	85 °C	4 min
4	4 °C	∞

Tabla 9. Condiciones de temperatura y tiempo de los ciclos de la retrotranscripción

PCR cuantitativa

Una vez obtenido el cDNA, llevamos a cabo la qPCR. Esta técnica nos permite estudiar la cantidad de RNA que se ha transcrito de nuestro gen de interés, el cual se cuantifica a través de la fluorescencia emitida por el reportero fluorescente, una molécula que se intercala entre las dos cadenas de doble hélice del cDNA. Cuando la señal de fluorescencia de la reacción cruza el valor umbral (*Threshold*), se considera que el nivel de fluorescencia ha aumentado con respecto al nivel de fluorescencia base. El valor C_T^{20} hace referencia al ciclo de la PCR en el que se ha alcanzado este umbral. Por tanto, la fluorescencia aumentará dependiendo de la cantidad de copias de cDNA generadas en la PCR: si en la muestra de cDNA existen muchas copias del gen de interés, necesitaremos un C_T más bajo para obtener el nivel mínimo de fluorescencia –es decir, para alcanzar el *Threshold*-. En el caso de otro gen que esté menos presente, se necesitarán más ciclos para alcanzar este C_T (Figura 8). Por ello, el valor C_T es el utilizado para calcular el número de copias del gen en nuestra muestra de cDNA, y, por tanto, la cantidad de mRNA de nuestro gen de interés.

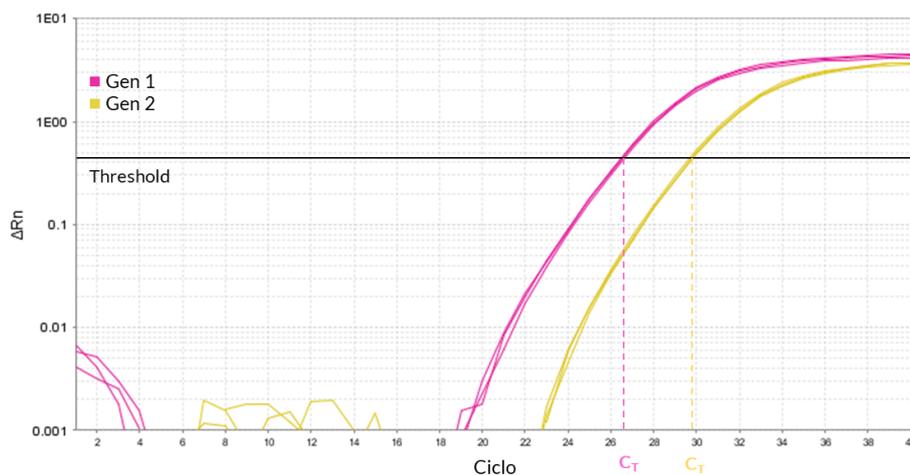


Figura 8. Representación gráfica del ΔRn (incremento de fluorescencia del reportero) de dos genes distintos. El dato obtenido (C_T) hace referencia al ciclo de la PCR en el que la señal de fluorescencia de la reacción cruza el valor umbral (*Threshold*). En este caso, el nivel de expresión del Gen 1 es mayor que el Gen 2, ya que tiene un C_T más bajo

²⁰ Del inglés *Threshold Cycle*

Para la reacción de la qPCR se utilizó como reportero fluorescente el medio comercial PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) junto con los pares de *primers* específicos para cada gen de interés a una concentración final de 1 μ M (Tabla 10) y agua Milli-Q. La reacción se realizó por triplicado para cada muestra analizada, con los respectivos controles negativos. Para la normalización de los datos se empleó como gen de referencia el de la enzima Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*²¹).

Análisis de datos

Los resultados de la qPCR nos permitieron llevar a cabo dos análisis distintos: en primer lugar, estudiar cómo varía la expresión génica por edades, dentro de la misma condición genotípica y, en segundo lugar, comparar posibles variaciones de la expresión de cada gen de interés entre genotipos, es decir, entre ratones WT y PCD, a diferentes edades.

En ambos casos, los cambios en la expresión génica se calcularon usando la cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_T$; detallado en las fórmulas más adelante), que nos permite comparar la expresión de cada gen de interés entre dos muestras, ya sea de distinto genotipo o edad, y normalizándolo respecto a la expresión del gen constitutivo, el *Gapdh*.

En primer lugar, llevamos a cabo el análisis entre edades dentro del mismo genotipo, para conocer cómo fluctúa la expresión génica a lo largo del tiempo; por tanto, el cambio relativo en el nivel de expresión o *fold change* (ver más adelante) se calculó comparando los C_T de las distintas edades analizadas, tratando a los ratones WT y PCD independientemente. Para este análisis, usamos la edad P10 como referencia, por ser una edad anterior al comienzo de la pre-neurodegeneración, y a la que se presupone que no hay ningún tipo de alteración (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978). Para ello, utilizamos la siguiente fórmula:

$$\text{Fold Change}_{\text{edad}} = 2^{\left(\frac{(C_T \text{ P10} - C_T \text{ edad}) \text{ gen de interés}}{(C_T \text{ P10} - C_T \text{ edad}) \text{ gen constitutivo}} \right)}$$

²¹ Del inglés *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

Por otro lado, realizamos los análisis comparando genotipos. En este caso comparamos la expresión de cada gen entre ratones WT y PCD, y lo normalizamos a *Gapdh*, siendo los animales WT los sujetos de referencia, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Fold Change}_{\text{genotipo}} = 2^{\left(\frac{(\text{Ct WT} - \text{Ct PCD}) \text{ gen de interés}}{(\text{Ct WT} - \text{Ct PCD}) \text{ gen constitutivo}}\right)}$$

El uso de estas fórmulas nos da un valor conocido como *fold change*, que representa la medida de cuánto cambia la expresión del gen de interés entre dos muestras. Si el *fold change* es igual a 1, significa que no existen diferencias en la expresión del gen de interés entre ellas; si el *fold change* es < 1, la expresión está disminuida; finalmente, si es > 1, se encuentra aumentada.

Primers y curvas estándar

Los oligonucleótidos elegidos como cebadores o *primers* (Tabla 10) fueron diseñados mediante la herramienta online *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* de Roche (actualmente no disponible). A continuación, comprobamos el alineamiento y especificidad de los *primers* diseñados, mediante el uso de la herramienta BLAST/BLAT²² de Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>). Además, verificamos la eficiencia y la regresión lineal de la reacción para cada par de *primers* mediante la realización de curvas estándar con diluciones seriadas de concentraciones conocidas del cDNA (1:10, 3:10, 1:100 y 1:1000). La elección de los *primers* se basó en las características óptimas de la curva estándar. Ésta debía tener una pendiente de la recta cercana a -3,33, coeficiente de correlación $R^2 > 0,99$, porcentaje de eficiencia > 99,99% y error < 0,0001.

Gen	Primer sentido	Primer antisentido
<i>Igf-1</i>	GAAGACGACATGATGTGTATCTTTATC	AGCAGCCTTCCAACCTCAATTAT
<i>Bdnf</i>	GTGGTGTAAGCCGCAAAGA	AACCATAGTAAGGAAAAGGATGGTC
<i>Vegf-A</i>	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA	AAAAACGAAAGCGCAAGAAA
<i>Vegf-B</i>	AGGAGGTTGCCTGTGCT	GCTCAACCCAGACACCTGTAG
<i>Gapdh</i>	GCCTATGTGGCCTCCAAGGA	GTGTTGGGTGCCCTAGTTG

Tabla 10. Secuencias de los *primers* utilizados en la técnica qPCR.

En cada análisis llevamos a cabo controles de especificidad, donde incluimos un control negativo en el que sustituimos la muestra de cDNA por agua Milli-Q, con el fin de detectar una posible contaminación o anillamiento de *primers*.

²² Del inglés *Basic Local Alignment Search Tool*

ANÁLISIS PROTEICO

Además de estudiar la expresión de RNA mediante qPCR, decidimos analizar la expresión proteica de los cuatro factores neurotróficos anteriores (IGF-1, BDNF, VEGF-A y VEGF-B), ya que un aumento en la expresión génica no implica necesariamente un aumento en la producción de proteínas. La técnica ELISA se hizo de forma complementaria y como confirmación de los datos obtenidos en el estudio génico mediante qPCR, ya que nos permite conocer de forma cuantitativa la producción proteica de los genes de interés. Por ello, únicamente llevamos a cabo este análisis a las edades fundamentales de la neurodegeneración, P15 y P25, y en aquellas en las que observamos cambios de expresión génica mediante qPCR (P40 para *Igf-1* y P20 para *Vegf-B*). Adicionalmente, analizamos la expresión proteica en el plasma sanguíneo a las mismas edades que el análisis de proteínas realizado en el tejido cerebeloso.

Preparación de las muestras y cuantificación de proteínas

Como se ha comentado anteriormente, el análisis de la expresión proteica mediante ELISA se realizó sobre la mitad derecha del cerebelo de los mismos ratones usados para el análisis de la expresión génica mediante qPCR (Figura 7). Por tanto, el proceso de extracción y conservación del tejido es idéntico al mencionado en el apartado *Extracción de muestra en fresco*. A continuación, llevamos a cabo el homogeneizado de las muestras.

Para ello, las porciones de tejido se lavaron con PBS para eliminar el exceso de sangre, tras lo que se les añadió la cantidad de PBS necesaria para la realización del test –especificado en el protocolo de cada kit–, y se disgregaron mecánicamente con la ayuda de un pistilo. Tras ello, se centrifugaron durante 5 minutos a 5.000 r.p.m. a 4 °C y el sobrenadante se pasó a tubos nuevos.

Por su parte, para los análisis proteicos del plasma sanguíneo, recogimos la sangre en EDTA en el momento del sacrificio de los ratones usados para los análisis moleculares. A continuación, centrifugamos la muestra durante 10 minutos a 5000 r.p.m. y recogimos el sobrenadante.

Una vez preparada la muestra, se llevó a cabo la cuantificación de la cantidad total de proteínas mediante el método de Bradford. El reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) toma un color azul más o menos intenso en presencia de proteínas. Teniendo en cuenta el pequeño tamaño del tejido cerebeloso disponible, las muestras se diluyeron 1:2 en

solución salina, mientras que el plasma sanguíneo se diluyó 500 veces en el diluyente proporcionado en cada kit comercial.

A continuación, se mezclaron por duplicado 15 μ l de cada muestra diluida –plasma o tejido– con 500 μ l de reactivo Bradford. Tras una incubación de 5 minutos, se midió la absorbancia en el espectrofotómetro SmartSpec™ Plus Spectrophotometer (BioRad, CA, EE. UU.), usando una recta patrón previamente establecida. Finalmente, utilizando las absorbancias y la recta patrón, se calculó la cantidad de proteína total en mg/ml.

Procedimiento del ensayo

Tras el proceso de cuantificación de la cantidad de proteína total, llevamos a cabo el análisis ELISA propiamente dicho. Los kits usados, IGF-1 (MG100, RyD Systems, MN, EE. UU.), BDNF (EM0020, FineTest, China), VEGF-A (MMV00, RyD Systems) y VEGF-B (SEA144Mu, USCN, China), se basan en la técnica sándwich, en los que el antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno situado en el fondo del pocillo y otro de detección, que se unen a dos epítomos distintos del antígeno.

Preparamos los reactivos, las diluciones estándar, el control y las muestras siguiendo el protocolo de fabricación correspondiente. Todas las muestras se analizaron por duplicado y las absorbancias se midieron usando un lector de microplacas (LT-4000, Euroclone, Pero, Italy).

Interpretación de los resultados

Los datos obtenidos en el lector de microplacas se usaron para calcular los resultados. En primer lugar, hicimos la media de la densidad óptica de los duplicados obtenidos de las diluciones estándar, que nos permitieron crear la recta patrón, y corregimos los datos restando la densidad óptica del valor “cero” a todas las medias.

Con estos datos, creamos la recta patrón usando el programa GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad, CA, EE. UU.). Con la recta patrón creada, y mediante el uso del programa GraphPad, inferimos los resultados obtenidos de la densidad óptica de las muestras de interés a valores de pg/ml.

Este valor se multiplicó por el volumen de diluyente añadido inicialmente a la muestra, obteniendo la cantidad de proteína de cada factor neurotrófico en pg. A continuación, dividimos los pg de cada factor entre los mg de proteína total, obteniendo el valor final (pg / mg total) que utilizamos para la interpretación de los datos.

TERAPIA CON FACTORES NEUROTRÓFICOS

Para la terapia con factores neurotróficos se administraron las proteínas recombinantes humanas rhIGF-1 (Cat: 100-11, Peprotech, NJ, EE. UU.) o rhVEGF-B (Cat: 100-20B, Peprotech), puesto que fueron estos los factores que mostraron variación en los ratones PCD.

Durante las últimas décadas, numerosos estudios han evaluado las propiedades terapéuticas de rhIGF-1 sobre diversas patologías, entre las que destacan las enfermedades neurodegenerativas. Por ello, para elegir la pauta de administración nos basamos en estudios previos; en todos ellos el rhIGF-1 se administró de manera continuada durante largos periodos de tiempo (Castro *et al.*, 2014; Puche *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2018), entre otros). Por lo tanto, teniendo en cuenta las alteraciones observadas en cuanto a la expresión génica y proteica de IGF-1 a lo largo del tiempo, y el proceso degenerativo del ratón PCD, el rhIGF-1 se administró diariamente desde P20 a P30.

Por el contrario, el tratamiento con rhVEGF-B es menos usado y no hay suficiente información al respecto. En la mayoría de los estudios consultados, se usó este factor neurotrófico para tratar patologías retinianas mediante inyección intravitreal o infusión directa en el cerebro (Yue *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016).

En el caso de la administración intravitreal, la pauta se espació en el tiempo, normalmente cada 5 días (Huang *et al.*, 2016; Arjunan *et al.*, 2018). En este caso, puesto que las alteraciones génicas y proteicas de VEGF-B observadas en el ratón PCD comenzaron a P15, decidimos administrar el rhVEGF-B entre P10 y P20.

Por otro lado, teniendo en cuenta el proceso neurodegenerativo del PCD –que ocurre de manera rápida y agresiva–, decidimos administrarlo cada dos días. Adicionalmente, tras las mejoras observadas con el tratamiento anterior (ver *Resultados*), decidimos administrar rhVEGF-B diariamente –de forma similar al tratamiento con rhIGF-1–, en las mismas edades descritas para este factor neurotrófico, desde P10 a P20.

Además, tratamos a un grupo de animales únicamente con NaCl 0,9 % (p/v) para descartar los posibles efectos de la administración intraperitoneal continuada, debidos al estrés ocasionado por la inmovilización o el daño de la aguja, entre otros (Morton *et al.*, 2001).

Para la preparación de las proteínas recombinantes de IGF-1 y VEGF-B, los compuestos se centrifugaron y se reconstituyeron con agua Elix a una dilución de 0,5 mg/ml. Para almacenarlos a largo plazo, los diluimos en un tampón que contenía 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA²³; Sigma-Aldrich) y lo guardamos en alícuotas a -20 °C. El día de la administración, ambos fármacos se prepararon en fresco, evitando así la degradación de los compuestos. Cada fármaco se diluyó en NaCl 0,9 % (p/v) hasta llegar a la concentración de uso, que fue de 25 µg/ml para rhIGF-1 y 1,5 µg/ml para rhVEGF-B, basándonos en estudios previos (Castro *et al.*, 2014; Yue *et al.*, 2014), y en la dosis efectiva recomendada (Prepotech). Ambas sustancias se administraron por vía intraperitoneal con una jeringa de insulina (0,5 ml, 30G x 8mm; Becton Dickinson, NJ, EE. UU.) en un volumen de 10 µl/g del peso del animal, como se ha descrito anteriormente (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Pérez-Martín, 2022).

Todos los animales tratados recibieron su pauta correspondiente por la mañana entre las 9 y las 12 a.m., y se monitorizó su peso corporal durante el tiempo que se extendieron los procedimientos experimentales.

ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO MOTOR, COGNITIVO Y SOCIAL

Para comprobar la existencia de una posible mejora en las funciones motoras, cognitivas y sociales del ratón mutante PCD tras los diferentes tratamientos administrados, llevamos a cabo una batería de pruebas de comportamiento relacionadas con estas funciones cerebelosas. Los análisis se realizaron a diferentes edades en función del tratamiento usado: en el caso de rhIGF-1, puesto que el tratamiento comenzó a P20, se llevaron a cabo las pruebas de comportamiento a P25 y P30.

Por su parte, en los ratones tratados con rhVEGF-B las pruebas se realizaron a P17, P25 y P30, ya que el tratamiento comenzó a P10, y estudios previos de nuestro grupo mostraron alteraciones en las tareas motoras, cognitivas y sociales en los ratones PCD a partir de P17 (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Todas las pruebas se realizaron en el mismo orden entre las 9 a. m. y las 2 p. m. con un mínimo de 10 minutos de descanso entre cada una de ellas, y fueron grabadas con una cámara digital de video, para su posterior análisis usando el software AnyMaze (Stoelting Co., IL, EE. UU). Todos los aparatos y objetos utilizados se lavaron con etanol al 70% (v/v) antes y después de cada animal y sesión para minimizar la posible influencia de olores.

²³ Del inglés *Bovine Serum Albumin*

Análisis de la memoria de reconocimiento

La prueba de reconocimiento de objetos novedosos o NOR (ver *Introducción*) se usa para analizar la memoria de reconocimiento en roedores (Ennaceur, 2010; Ennaceur y Delacour, 1988; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Esta prueba se llevó a cabo en jaulas estandarizadas de mantenimiento Sealsafe modelo 1285L cubiertas con viruta Safe Selet Fine (Safe Bedding, Rosenberg, Alemania), similares a las usadas para el mantenimiento de la colonia. A cada animal se le asignó una jaula, y esta individualización se mantuvo en el tiempo, evitando así la influencia de nuevos olores y el estrés ocasionado por el cambio de ambiente. Un día antes del comienzo de las pruebas de comportamiento llevamos a cabo una habituación a las jaulas durante 10 minutos. A continuación, colocamos dos objetos idénticos en esquinas opuestas de la diagonal de la jaula, introducimos al animal y le dejamos explorar durante 10 minutos (Figura 9 A). Este objeto será lo que llamaremos objeto familiar.

El día de las pruebas, colocamos al animal en su jaula correspondiente y le dejamos 10 minutos de habituación. A continuación, colocamos los dos objetos familiares en esquinas opuestas de la jaula –similar a lo explicado anteriormente– y le dejamos explorar durante 10 minutos. Tras la adaptación al objeto familiar, cambiamos uno de estos objetos por un objeto diferente, denominado objeto novedoso, que no había sido previamente presentado (Figura 9 B). Colocamos al animal en el centro de la jaula para dar comienzo a la prueba, que consistió en la exploración libre de ambos objetos por parte del animal durante 10 minutos, considerándose exploración efectiva cuando el ratón se sitúa a una distancia menor de 2 cm de cada objeto –variables programadas en el software de análisis AnyMaze–. Todos los objetos son de plástico de igual tamaño y textura, pero con diferentes formas y colores. En cada edad de análisis, cambiamos la posición de los objetos en esquinas opuestas con el objetivo de evitar la influencia de la memoria espacial (Ennaceur, 2010; Ennaceur y Delacour, 1988).

Con esta prueba obtenemos dos tipos de medidas. En primer lugar, el porcentaje de tiempo de exploración del objeto novedoso (TN) y del familiar (TF). De manera general, los roedores, debido a su carácter explorador, tienden a pasar un mayor porcentaje de tiempo explorando el objeto desconocido.

Se ha descrito la presencia de una afectación en la memoria de reconocimiento cuando se observa un mayor tiempo explorando el objeto familiar, pudiendo ser este igual o incluso superior al tiempo de exploración del objeto novedoso (Ennaceur y Delacour, 1988; Antunes y Biala, 2012). Los porcentajes de tiempos de exploración fueron calculados con las siguientes fórmulas (descrito anteriormente en Pérez-Martín, 2022):

$$\% T_N = T_N / (T_N + T_F) \qquad \% T_F = T_F / (T_N + T_F)$$

En segundo lugar, obtenemos el índice de discriminación (DI^{24}), que representa la capacidad de discriminación entre ambos objetos. Puede variar entre +1 y -1 en función del tiempo de exploración. Los valores positivos ($DI > 0$) indican que el animal pasa más tiempo explorando el objeto novedoso, por tanto, es capaz de discriminar ambos objetos. Por el contrario, los valores neutros o negativos ($DI \leq 0$) indican ausencia de discriminación, por lo que encontramos una memoria de reconocimiento afectada. El DI se calcula de la siguiente forma (descrito anteriormente en Pérez-Martín, 2021):

$$DI = (T_N - T_F) / (T_N + T_F)$$

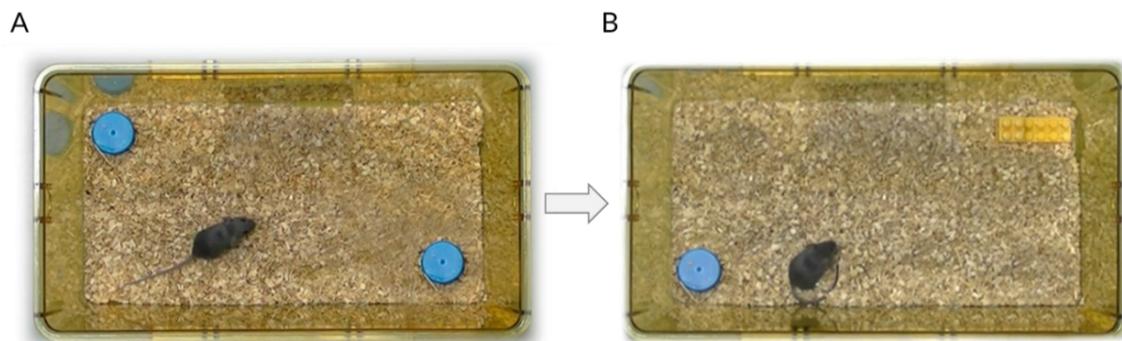


Figura 9. Representación gráfica de la prueba de reconocimiento de objetos novedosos. Antes del comienzo de la prueba se deja que el animal explore los objetos durante 10 minutos (A), siendo este el objeto familiar (azul). A continuación, cambiamos uno de los objetos familiares por uno nuevo y comienza la prueba (B).

²⁴ Del inglés *Discrimination Index*

Análisis de preferencia social

Para el análisis del comportamiento social usamos la prueba de preferencia social, que nos permite evaluar en roedores la preferencia por la interacción con un congénere comparándola con la interacción con un objeto inanimado (Moy *et al.*, 2004).

Esta prueba se llevó a cabo en una caja de plexiglás blanca (50 x 29 cm) dividida en tres compartimentos de igual tamaño (29 x 16,67 cm) comunicados entre sí (Figura 10). Antes de la realización de la prueba, llevamos a cabo un periodo de adaptación en el que el animal explora libremente la caja durante 10 minutos (Figura 10 A). Tras este periodo, el animal objeto de estudio se retira y se coloca otro ratón –de edad y sexo similar al que se le está realizando la prueba– en uno de los compartimentos, y un objeto similar a los utilizados en la prueba NOR en el compartimento lateral opuesto (Figura 10 B). Tanto el animal como el objeto se encuentran cubiertos con un recipiente que permite la interacción social y olfativa, pero evita la interacción física directa. Para la realización de la prueba, colocamos de nuevo al animal a analizar en el compartimento central y le dejamos explorar durante 10 minutos. De forma similar a la prueba anterior, en los diferentes días en los que se realizó la prueba, se contrabalanceó la posición del estímulo social (el animal) y no social (el objeto) para evitar la influencia de la memoria espacial (Moy *et al.*, 2004).

De forma análoga a lo descrito anteriormente, esta prueba nos da información acerca de dos medidas. En primer lugar, obtenemos el porcentaje de tiempo de exploración en el compartimento donde se encuentra el animal, es decir, el estímulo social (T_A), y el porcentaje de tiempo explorando el compartimento que contiene el objeto, el estímulo no social (T_O).

Puesto que los ratones son animales sociales, en animales WT cabe esperar un mayor porcentaje de tiempo explorando el compartimento que contiene el ratón, comparado con el porcentaje de tiempo explorando el compartimento contrario. Por tanto, para aquellos ratones en los que el porcentaje de interacción con el estímulo no social es mayor o igual al porcentaje de tiempo de interacción con el estímulo social, se puede considerar un déficit en el comportamiento social (Pérez-Martín *et al.*, 2021). El porcentaje de interacción se calcula mediante el uso de las siguientes fórmulas:

$$\% T_A = T_A / (T_A + T_O) \qquad \% T_O = T_O / (T_A + T_O)$$

Por otro lado, esta prueba nos da información acerca del índice de sociabilidad (SI²⁵; (Pérez-Martín *et al.*, 2021), que nos informa sobre la preferencia social de los ratones analizados. Puede variar entre +1 y -1, de forma que los valores positivos (SI > 0) indican una preferencia por la interacción social, los valores próximos a 0 indican la no preferencia por ninguna de las opciones, y los valores negativos (SI < 0), nos informan acerca de la evitación por la interacción social. Este índice se calcula mediante la siguiente fórmula (Pérez-Martín *et al.*, 2021):

$$SI = (T_A - T_O) / (T_A + T_O)$$

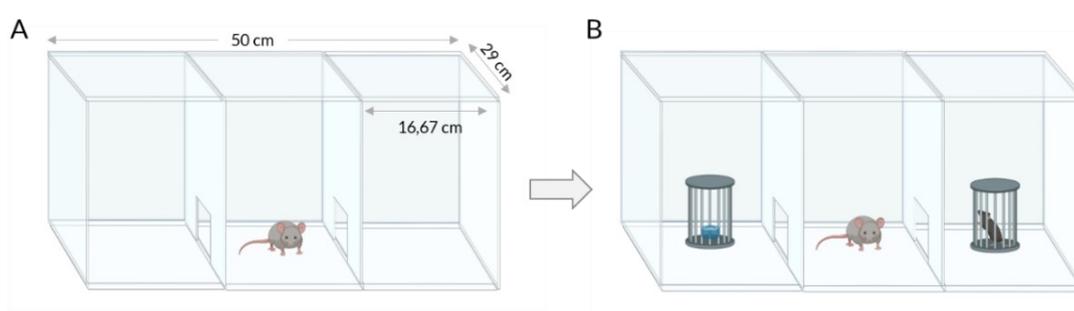


Figura 10. Representación gráfica de la prueba de comportamiento social. Antes de la realización de la prueba, se somete a los animales a la adaptación al entorno durante 10 min (A), tras lo que comienza la prueba (B).

Análisis del comportamiento motor

El test *Rotarodo* la prueba de la varilla giratoria es un método estandarizado que permite medir la habilidad motora de los ratones (Schönfeld *et al.*, 2017; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Pérez-Martín *et al.*, 2021). Para ello usamos el sistema *Rotarod* LE8200 (Panlab, Barcelona, España) que consiste en una varilla giratoria de 3,5 cm de diámetro dispuesta horizontalmente y con discos separadores que permiten colocar varios ratones a la vez sin que se produzca una interacción entre ellos (Figura 11). La varilla gira a una velocidad de 4 r.p.m., que va aumentando hasta llegar a 40 r.p.m. en 10 minutos, es decir, gira con una aceleración de 3,6 r.p.m./min (0,06 r.p.m./s).

²⁵ Del inglés *Sociability Index*

Una vez los ratones están colocados, la prueba comienza y éstos deben desplazarse en sentido opuesto al giro de la varilla para evitar caerse. Cuando el ratón cae, acciona la plataforma basculante individual que se encuentra en la base del dispositivo. Así se detiene el cronómetro para cada animal, informando sobre la velocidad máxima de rotación y el tiempo de latencia, es decir, el tiempo que tardó en caerse el ratón de la varilla. La prueba de *Rotarod* se realizó 7 veces a cada animal para cada edad de análisis, dejando intervalos de descanso de 20 minutos entre cada intento. Tras ello, se calculó la media de estos siete valores de latencia a la caída por cada animal y edad analizados.



Figura 11. Representación gráfica de la prueba *Rotarod*.

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Obtención y preparación del tejido: sacrificio y disección

El análisis histológico se realizó a diferentes edades y con diferentes técnicas dependiendo del experimento y objetivo del análisis, tal y como se ha descrito en el apartado de *Diseño experimental general*. En este apartado explicaremos el procedimiento seguido, según los análisis llevados a cabo: análisis neuronal, análisis del músculo esquelético y análisis mitocondrial. Para una mejor comprensión de los métodos, explicaremos de manera conjunta aquellos en los que el procedimiento fue similar.

Para el **análisis neuronal tras el tratamiento con factores neurotróficos** (rhIGF-1, rhVEGF-B o NaCl 0,9 %), los animales utilizados se sacrificaron a P30, edad en la que la degeneración cerebelosa afecta de una manera pronunciada a todos los lóbulos del vermis excepto al lóbulo X (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007); Hernández-Pérez *et al.*, 2023). Además, debido a que en el tratamiento con rhVEGF-B observamos un notable efecto neuroprotector a P30 (ver *Resultados*), ampliamos las edades de análisis a P25, edad a la que se analizó tanto la viabilidad neuronal como la apoptosis en un nuevo grupo experimental.

El **análisis del tejido muscular** tras el tratamiento con factores neurotróficos se realizó a P30 en ratones WT, PCD y PCD tratados con rhVEGFB. Se trata de uno de los análisis del estudio avanzado de la neuroprotección ejercida por este factor neurotrófico.

El sacrificio de los ratones –usados tanto para el análisis neuronal como muscular– se realizó mediante exanguinación previa anestesia por inyección intraperitoneal de hidrato de cloral al 5 % (p/v; Sigma-Aldrich) en un volumen de 10 µl/g (peso del animal). El efecto anestésico se comprobó mediante la ausencia del reflejo podal y de compresión de la cola. Una vez anestesiados los animales, se administraron 10 µl de heparina sódica (1.000 U/ml; Sigma-Aldrich) a cada ratón por vía intraaórtica a través del ventrículo izquierdo del corazón. Seguidamente, los ratones se perfundieron vía intracardiaca con una solución de lavado compuesta por NaCl 0,9 % (p/v), seguido del fijador de Somogyi –modificado sin glutaraldehído–, compuesto por paraformaldehído al 4 % (p/v; Panreac) y ácido pícrico saturado al 15 % (v/v; Panreac) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB), durante 15 minutos. La perfusión se realizó con una bomba peristáltica Minipuls 3 M312 (Gilson, WI, EE. UU.) con un flujo constante en función del peso del animal.

A continuación, se extrajo el encéfalo completo y una biopsia del músculo esquelético de la pata trasera (cuádriceps femoral) de cada animal. El encéfalo se dividió en tres bloques (rostral, medial y caudal) que se mantuvieron junto con el tejido muscular en postfijación en la misma solución fijadora durante 2 horas, en agitación y temperatura ambiente. A continuación, el tejido recogido se lavó con PB para eliminar el exceso de fijador y se crioprotegió sumergiéndolo en una solución de sacarosa al 30 % (p/v; Panreac) en PB, manteniéndolo en agitación a 4 °C hasta que las muestras se hundieron completamente. Por último, tanto los bloques del encéfalo como el músculo se congelaron con nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta el momento de su uso.

Posteriormente, llevamos a cabo el seccionamiento del tejido. Los bloques de cerebelo se cortaron en secciones parasagitales de 30 µm de grosor con un microtomo de deslizamiento modelo Jung SM 2000 (Leica Instruments, Wetzlar, Alemania) con una unidad de congelación acoplada (Frigomobil, Leica Instruments), a una temperatura entre -22 y -10 °C.

Las secciones se recogieron de forma seriada en placas multipocillo 6x4 (VWR International, OH, EE. UU.) que contenían PB. A continuación, se realizaron lavados en PB (3 x 10 min) para eliminar los restos de fijador y sacarosa de las secciones, las cuales se almacenaron a -20 °C sumergidas en una mezcla congeladora compuesta por glicerol al 30 % (v/v; VWR Chemicals) y polietilenglicol al 30 % (v/v; VWR Chemicals) en PB hasta su uso.

Para el seccionamiento del músculo, el tejido se encastró en OCT (Tissue-Tek, Sakura, CA, EE. UU.) usando moldes de plástico y se congeló con nitrógeno líquido.

A continuación, los moldes de plástico se eliminaron y el bloque con el tejido se seccionó con un criostato modelo Microm HM 560 (Thermo Scientific, MA, Estados Unidos) obteniendo secciones de 8 μm de grosor, con orientación longitudinal y transversal al eje mayor del músculo. Posteriormente el tejido se guardó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la tinción con hematoxilina y eosina (ver más adelante).

Por otro lado, para el **análisis de la calidad mitocondrial**, usamos un nuevo grupo de animales WT y PCD que se sacrificaron a tres edades distintas: P10, P15 y P25. El objetivo fue analizar la disfunción mitocondrial en relación con el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje, desde P10, momento en el que no hay ningún signo pre- o degenerativo, hasta P25, cuando observamos una degeneración notable. Por otro lado, para analizar la existencia de una mejora en la calidad mitocondrial tras el tratamiento con rhVEGF-B, usamos un nuevo grupo de animales PCD tratados, que analizamos a P25.

En este caso, el sacrificio de los animales fue similar al anterior, pero el fijador usado estaba compuesto únicamente por paraformaldehído al 4 % (p/v; Panreac) en PB a pH 7,4. De manera similar, se extrajo el encéfalo completo de cada animal y se dividió en tres bloques mediante cortes coronales; éstos se mantuvieron en postfijación durante 2 horas y se lavaron con PB (3 x 10 min). Sin embargo, en este caso, los bloques no se crioprotegieron, sino que se conservaron en PB con azida sódica (Panreac) al 5% (p/v) hasta su uso.

Los análisis posteriores se realizaron en colaboración con la Universidad de Colonia. El seccionamiento del tejido se realizó usando un vibratomo Leica VT1000S (Leica Instruments).

Para ello, embebimos los bloques de tejido en agarosa al 5 % (p/v; Sigma-Aldrich) en agua Elix. Una vez solidificada, cortamos los bordes sobrantes del bloque, lo pegamos al vibratomo y seccionamos el tejido obteniendo secciones de 50 μm en placas multipocillo con PBS.

A continuación, se realizaron lavados en PBS (3 x 10 min) para eliminar los restos de fijador y agarosa de las secciones, que se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ sumergidas en una mezcla congeladora compuesta por glicerol al 30 % (v/v; VWR Chemicals) y polietilenglicol al 30 % (v/v; VWR Chemicals) en PB hasta su uso.

Inmunofluorescencia indirecta

Usamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta para la detección y caracterización de diferentes tipos neuronales, basándonos en la expresión de epítomos antigénicos característicos.

En primer lugar, las secciones se lavaron en PBS (3 x 10 min) para retirar los restos del medio de almacenamiento. El procedimiento posterior fue diferente dependiendo del análisis realizado. Comenzando con el **análisis de la viabilidad de las células de Purkinje** tras el tratamiento con factores neurotróficos, las secciones se incubaron en agitación constante con el antisuero primario, que contenía el anticuerpo primario anti-calbindina D28k de ratón a una concentración de 1:2 000 (Swant, Burgdorf, Suiza) diluidos en PBS con suero normal de burro al 5 % (v/v; Cultek, Madrid, España) y Tritón X-100 al 0,2 % (v/v) durante 72 horas a 4 °C. A continuación, las secciones se lavaron en PBS (3 x 10 min) y se incubaron en agitación durante una hora y media a temperatura ambiente y oscuridad con el antisuero secundario, que contenía el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón Cy3 producido en burro (Jackson Immunoresearch, PA, EE. UU.) diluido en PBS a una concentración de 1:500. Diez minutos antes del fin de la incubación con el antisuero secundario, se añadió 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) a una dilución de 1:10 000 para contrateñir los núcleos celulares. Una vez terminada la incubación, las secciones se lavaron de nuevo (3 x 10 min), se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron usando un medio antidesvanecimiento que contenía glicerol al 70 % (v/v; VWR Chemicals), n-propil-galato al 5 % (p/v; Sigma-Aldrich), glicina al 0,42 % (v/v; VWR Chemicals) y azida sódica al 0,03 % (p/v).

En el caso del **análisis mitocondrial**, el procedimiento fue diferente. Tras el lavado de las secciones con PBS (3 x 10 min), se realizó una recuperación antigénica previa durante 30 minutos a 80 °C, con el tampón Tris-EDTA, que contenía tampón Tris 10 mM, EDTA (Sigma-Aldrich) 1 mM y Tween-20 0,05 % (v/v; Sigma-Aldrich) diluido en agua destilada, a pH 9. A continuación, llevamos a cabo una incubación con BSA 3 % (p/v; Sigma-Aldrich) en PBS para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos.

Tras ello, añadimos los anticuerpos primarios correspondientes (Tabla 11) diluidos en BSA 3 % (p/v) y los dejamos incubar toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, las secciones se lavaron con BSA 3 % (p/v; 3 x 10 min) y se incubaron con el antisuero secundario, compuesto por los anticuerpos secundarios correspondientes (Tabla 11) diluidos en BSA 3 % (p/v) a una concentración de 1:500 durante 2 horas a temperatura ambiente y oscuridad.

A continuación, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se incubaron con DAPI diluido en PBS durante 2-3 minutos a temperatura ambiente y oscuridad a una concentración 1:5 000 (v/v). Tras lavar las secciones de nuevo con PBS (3 x 10 min), se montaron sobre portaobjetos y se cubrieron usando el medio Aqua-Poly/Mount (Polyscience Inc., Hirschberg an der Bergstrasse, Alemania).

	Anticuerpos	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios	Calbindina D28k	Cobaya	1:500	Synaptic Systems
	PDH E1 subunidad α	Ratón	1:150	Abcam
	PC	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich
	SHMT2	Conejo	1:200	Sigma-Aldrich
	MTCO1	Ratón	1:200	Sigma-Aldrich
Anticuerpos secundarios	Alexa 488	Ratón	1:500	Abcam
	Alexa 488	Conejo	1:500	Abcam
	Alexa 546	Conejo	1:500	Abcam
	Alexa 594	Conejo	1:500	Abcam
	Alexa 647	Cobaya	1:500	Synaptic systems

Tabla 11. Anticuerpos primarios y secundarios usados para analizar la calidad mitocondrial mediante el uso de la técnica de inmunofluorescencia indirecta. PDH, del inglés *Pyruvate dehydrogenase E1 alpha subunit*; PC, del inglés *Pyruvate Carboxylase*; Shmt2, del inglés *Serine hydroxymethyltransferase 2*; MTCO1, del inglés *Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I*.

Para todos los análisis histológicos se eligieron secciones de vermis similares, en las que pudiéramos observar todos los lóbulos cerebelosos en su mayor tamaño.

Además, se llevaron a cabo diferentes controles con el fin de comprobar la especificidad de los anticuerpos empleados. Dichos controles fueron los siguientes:

- Omisión de los anticuerpos primarios, para detectar uniones inespecíficas.
- Omisión de los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos, para comprobar si existe fluorescencia inespecífica o autofluorescencia del tejido.
- En las dobles inmunofluorescencias, se incubaron las secciones omitiendo uno de los anticuerpos primarios y se añadió el anticuerpo secundario del primario omitido, para detectar posibles reacciones cruzadas. Repetimos el mismo procedimiento con el otro anticuerpo primario.

En ningún caso observamos marcaje inespecífico o falsos positivos, por lo tanto, pudimos validar las técnicas utilizadas.

Hematoxilina-eosina

Para el análisis del músculo esquelético usamos la tinción con hematoxilina y eosina. Esta tinción permite identificar diferentes tipos de células y tejidos ya que la hematoxilina tiñe de violeta azulado intenso las estructuras ácidas –principalmente los ácidos nucleicos presentes en los núcleos celulares–, mientras que la eosina es un colorante ácido que tiñe de rosa estructuras proteicas básicas contenidas en el citoplasma.

En primer lugar, las secciones se rehidrataron con diferentes concentraciones de etanol en sentido decreciente (100°-50°) hasta terminar con un lavado usando agua destilada. Tras estos lavados, se tiñeron con una solución de uso de hematoxilina (Panreac) durante 5-10 minutos y se lavaron con agua destilada. A continuación, se añadió el colorante ácido eosina (Panreac) durante 2 minutos y el tejido se volvió a deshidratar usando concentraciones crecientes de etanol, hasta llegar a etanol absoluto y xileno. Finalmente, las secciones se montaron usando Entellan (Merck, Darmstadt, Alemania) y un cubreobjetos para su posterior análisis.

Técnica TUNEL

La técnica TUNEL²⁶ se utiliza para detectar células en apoptosis. Este método se basa en el marcaje de los extremos 3'-OH libres que se generan en el DNA por acción de endonucleasas durante el proceso de muerte celular programada (Gavrieli *et al.*, 1992). Para ello, se emplea la transferasa terminal, una enzima que se une específicamente a los extremos 3'-OH libres y que añade desoxinucleótidos al azar. En esta técnica se utilizan nucleótidos dUTP biotinilados, que se pueden detectar con moléculas que se unen a la biotina, como la estreptavidina que usamos en nuestros experimentos (Figura 12).

En primer lugar, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min) y se fijaron con etanol:ácido acético 2:1 (v/v) durante 5 minutos. Lavamos las muestras con PBS (3 x 10 min) y se llevó a cabo la permeabilización del tejido con Triton X-100 0,2% (v/v) y citrato sódico 0,1% (p/v) en agua Elix durante 15 minutos. Las secciones se lavaron en PBS (2 x 5 min) y se incubaron en tampón TUNEL durante 30 minutos. A continuación, añadimos la transferasa terminal (2 µl/ml; Roche, Basilea, Suiza) y dUTP-biotinilado (1 µl/ml; Roche) en tampón TUNEL durante 1 hora y media a 37 °C.

²⁶ Del inglés *Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-Labeling*

La reacción se paró con tampón citrato sódico salino (2 x 10 min), y las secciones se lavaron en PBS (3 x 10 min). Después, las secciones se incubaron con estreptavidina conjugada con Cy2 (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories) diluida en PBS y los núcleos se contratiñeron con DAPI. Finalmente, las secciones se lavaron con PBS (3 x 10 min), se montaron sobre portaobjetos gelatinizados y se cubrieron usando un medio antidesvanecimiento, tal y como se ha descrito en el apartado *Inmunofluorescencia indirecta*.

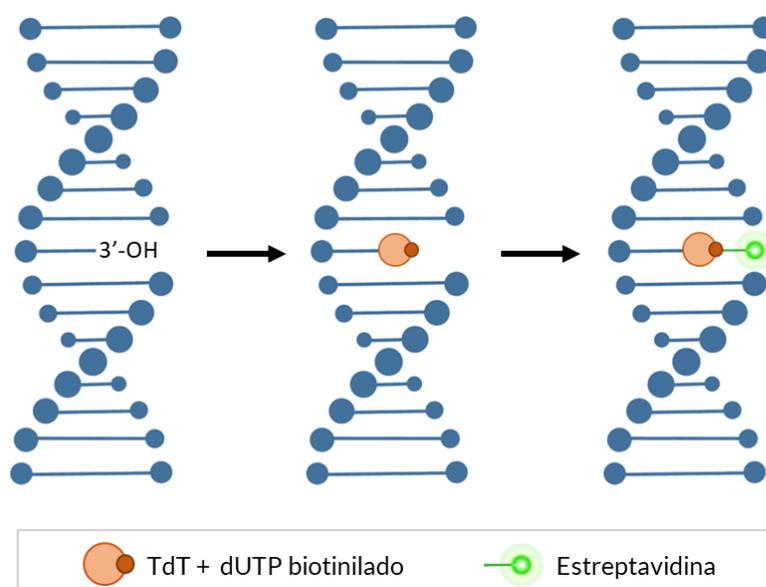


Figura 12. Descripción gráfica de la técnica TUNEL. La transferasa terminal (TdT) se une a los extremos 3'-OH libres del DNA fragmentado. Esta enzima añade nucleótidos dUTP biotinilados, a los que se une la estreptavidina para su detección.

Visualización al microscopio y análisis de imagen

Para todos los análisis histológicos cuantitativos se emplearon cuatro secciones de vermis cerebeloso por animal, y se realizó la media entre estas cuatro secciones, obteniéndose así datos menos variables.

Para el estudio del efecto neuroprotector de los diferentes tratamientos farmacológicos – análisis de supervivencia neuronal y apoptosis–, las secciones se observaron con un microscopio de epifluorescencia Olympus Provis AX70 acoplado a una cámara digital Olympus DP70 (Olympus, Tokio, Japón) y se hizo un recuento manual de las células de Purkinje positivas a calbindina. En el caso del análisis de células apoptóticas mediante TUNEL, únicamente se contaron aquellas células positivas presentes en la capa de células de Purkinje.

A continuación, se midió la longitud de la capa de las células de Purkinje usando el programa Neurolúcida (MBF Bioscience, VT, EE. UU), y se calculó la densidad lineal (bien de células de Purkinje, bien de células en apoptosis). De manera general, todos los recuentos celulares se realizaron teniendo en cuenta el vermis cerebeloso completo (lóbulos I al X), o de forma separada, analizando los lóbulos I-IX en conjunto, y el lóbulo X aparte, dada su mayor resistencia a la neurodegeneración (Hernández-Pérez *et al.*, 2023).

El análisis del tejido muscular se realizó tanto longitudinal como transversalmente usando el cuádriceps femoral. Para su análisis, tomamos fotos de las fibras musculares de cada sección a 20x (Figura 13) y las analizamos posteriormente mediante el uso de una macro semiautomática del Software ImageJ creada por el Dr. Jorge Valero, miembro de nuestro grupo de investigación. Para ello, tras calibrar la imagen, comenzamos separando los colores mediante la opción *color deconvolution*. A continuación, analizamos y creamos las distintas regiones de interés (ROI²⁷) segmentando los elementos dependiendo del tamaño de la fibra.

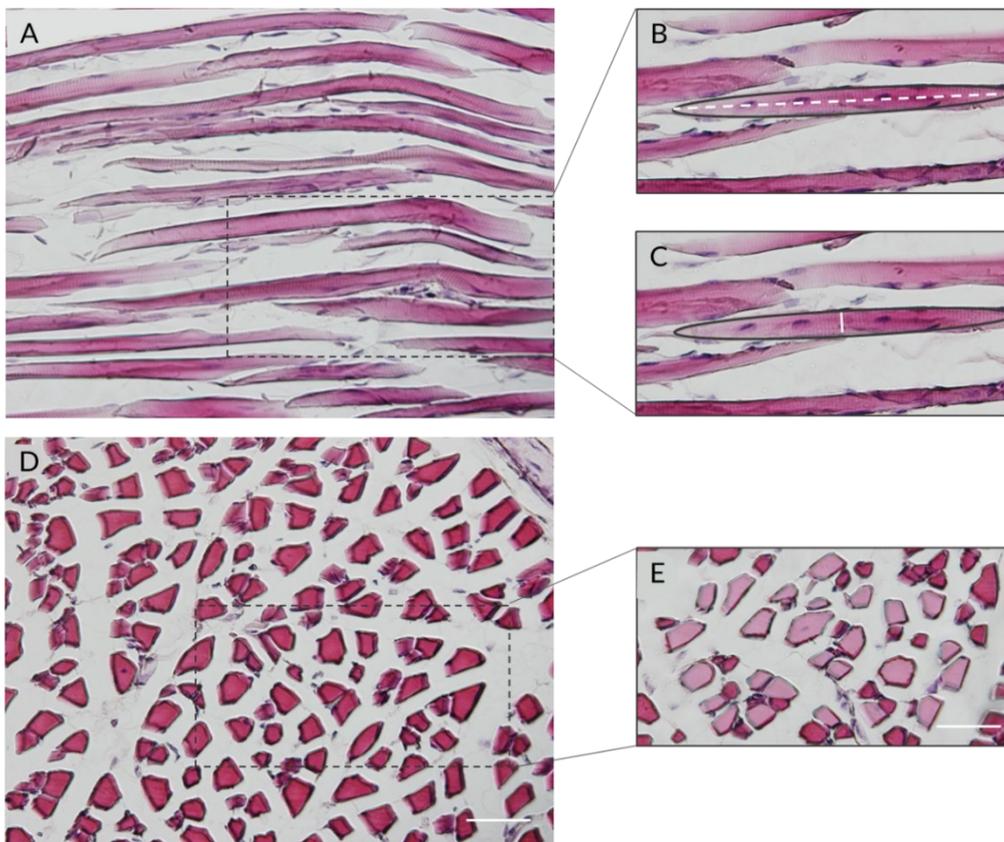


Figura 13. Representación del análisis realizado en el músculo esquelético. (A-C) Análisis del músculo esquelético cortado longitudinalmente (A), en el que analizamos la longitud máxima (B) y mínima (C) de la fibra muscular. (D, E) Análisis del músculo esquelético cortado transversalmente (D), en el que se analiza el área transversal media de las fibras (E). Barra de escala 50 μ m.

²⁷ Del inglés *Region Of Interest*

En el análisis longitudinal (Figura 13 A-C), el programa convierte cada fibra muscular en una elipse, y nos da información acerca del eje mayor (Figura 13 B) y menor (Figura 13 C) de la elipse, es decir, de la longitud y anchura estimadas de cada fibra muscular, respectivamente. Para análisis del músculo en corte transversal (Figura 13 D), analizamos el área transversal media de cada fibra, mediante un análisis informático similar (Figura 13 E).

El análisis de la calidad mitocondrial mediante inmunofluorescencia se llevó a cabo usando el microscopio Confocal Stellaris 5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania). Para ello, se tomaron de media diez fotos de las células de Purkinje de cada sección de vermis a 63x. El análisis se realizó atendiendo a la densidad integrada, un valor que engloba la intensidad de cada marcador y el área celular que ocupa, todo ello relativizado al área del soma de la célula de Purkinje (determinado con inmunofluorescencia para calbindina; Figura 14).

Este análisis se realizó de manera semiautomática usando la macro de ImageJ *Thresholder* creada por el Prof. Jorge Valero (Perez-Boyero *et al.*, 2023; <https://github.com/Jorvalgl/Thresholder>). Para ello, analizamos de forma general todas las medidas de intensidad posibles según el umbral de exposición o *threshold* de cada imagen (entre 0, o nula exposición, y 255 o saturación total). A continuación, para un análisis más preciso, de esa curva general, elegimos un *threshold* representativo para cada marcador, de manera que definiese una intensidad del marcaje resultante nítida, pero sin llegar a la saturación.

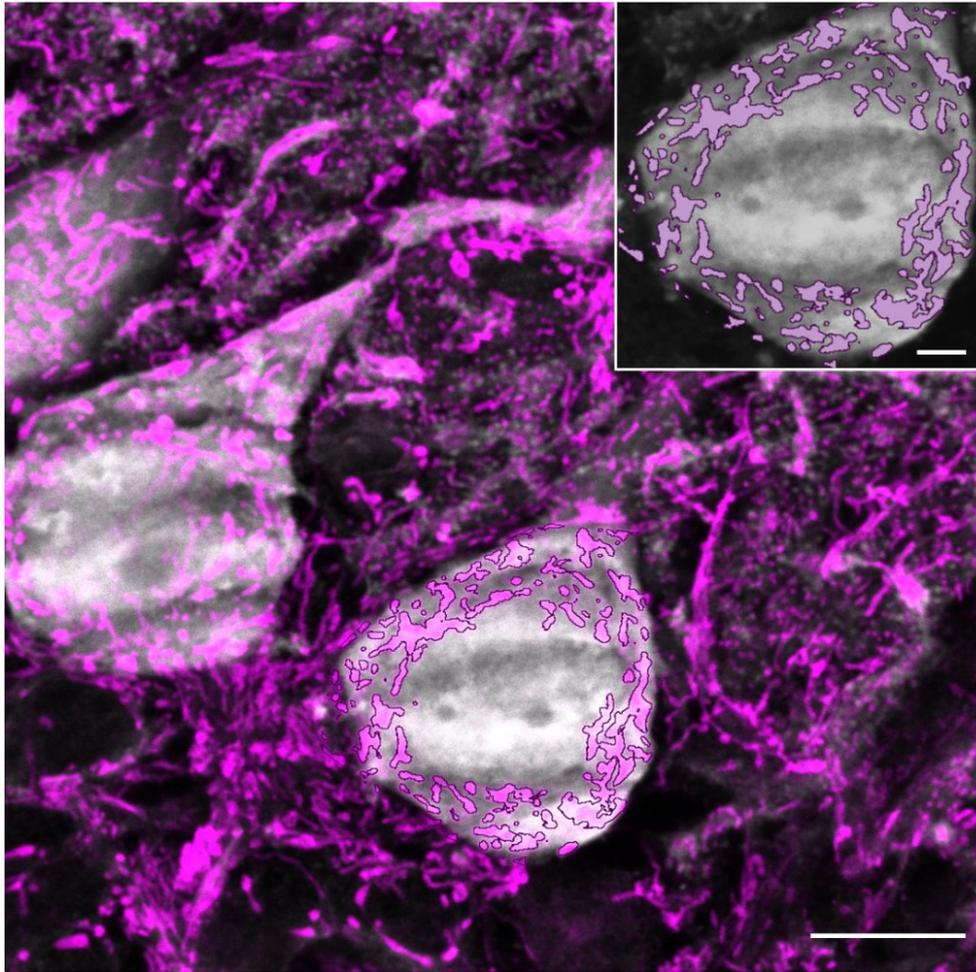
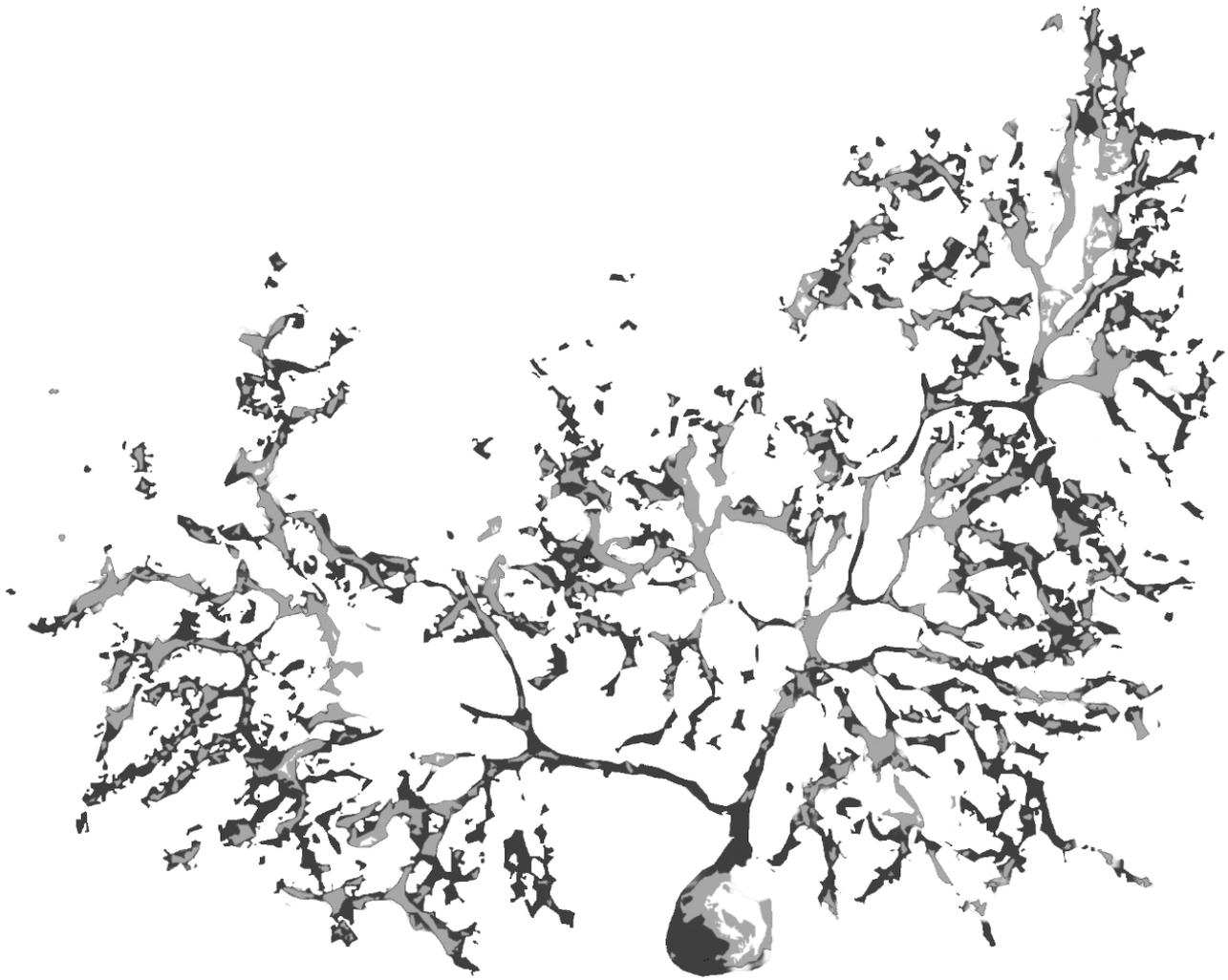


Figura 14. Análisis de los diferentes marcadores mitocondriales mediante el uso de la macro Thresholder de ImageJ. La densidad integrada es un parámetro que analiza la intensidad del marcador y el área que ocupa (en magenta), y relativiza todo ello al área total del soma neuronal (en gris). Barra de escala 10 μm y 3 μm (ampliación).

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

De manera general, debido al tamaño de la muestra, todos los análisis realizados fueron no paramétricos, utilizando las pruebas U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, en función del número de grupos experimentales. Sin embargo, para realizar el análisis estadístico de la prueba *Rotarod* se empleó el test ANOVA de una vía con medidas repetidas, con el fin de conocer la interacción entre las variables analizadas, ya que puede existir influencia en la realización de la prueba debido al aprendizaje. En todos los casos, el nivel de significación estadística mínima se estableció en $p < 0,05$.

Debido a la variedad de pruebas estadísticas empleadas, en cada sección de resultados se indicará el análisis específico utilizado. Todos los datos están representados como la media \pm el error estándar de la media (ESM). Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa estadístico SPSS versión 28 para Windows (IBM, NY, EE. UU.).



RESULTADOS

El propósito general de la presente Tesis Doctoral es la búsqueda de nuevos fármacos que eviten o frenen la muerte neuronal del ratón mutante PCD. Para ello, en primer lugar, realizamos un screening en el que analizamos la expresión génica y proteica de factores neurotróficos. El resultado de este estudio nos permitió diseñar un tratamiento farmacológico con las proteínas recombinantes humanas de los factores neurotróficos que se encuentran alterados en el ratón mutante PCD. Por tanto, el apartado de *Resultados* se divide en (1) La búsqueda de factores neurotróficos con efecto terapéutico, (2) Efecto del tratamiento con rhIGF-1, (2) Análisis del tratamiento con rhVEGF-B administrado cada dos días, (3) Efecto del tratamiento con rhVEGF-B administrado diariamente y (4) Análisis avanzado del efecto neuroprotector de rhVEGF-B.

BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON EFECTO TERAPEUTICO

Cambios en la expresión génica de factores neurotróficos

Para la búsqueda de nuevas sustancias con capacidad terapéutica en nuestro modelo, decidimos enfocar este trabajo en el análisis de varios factores neurotróficos en el cerebelo de ratones WT y PCD. Para ello, evaluamos la expresión génica de *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* y *Vegf-B* a lo largo de todo el proceso neurodegenerativo del ratón mutante PCD: P10, P15, P20, P25, P30 y P40. Como se ha explicado en el apartado *Análisis molecular* de la sección de *Material y Métodos*, el estudio de la expresión génica de estos factores neurotróficos nos permitió realizar dos tipos de análisis: por un lado, consideramos la variación de dicha expresión a lo largo del tiempo, estudiando cada genotipo independientemente; por otro lado, evaluamos los cambios de expresión comparando los dos genotipos a cada una de las edades mencionadas anteriormente. Conviene recordar que para cada análisis de qPCR es necesario establecer un grupo de valores como referente con el que comparar el resto. Para la comparación de edades dentro de cada genotipo, se eligió P10; en los casos de comparaciones entre genotipos la referencia siempre fue el grupo WT.

Comenzando por el primer análisis descrito y una vez graficados los resultados, visualmente se aprecia un patrón de expresión diferente entre ratones WT y PCD. En los ratones WT (Figura 15 A-D), de manera general, la expresión de los factores neurotróficos analizados comienza siendo baja a P10 y P15; entre P20 y P30 observamos fluctuaciones con picos de expresión (concretamente a P20 y/o P30); finalmente, la expresión cae a P40 hasta valores similares a los de etapas tempranas (P10-P15).

En los ratones PCD (Figura 15 E-H), a P10 y P15 la expresión es baja, de forma similar a los WT. Sin embargo, en la mayoría de los factores, vemos un aumento progresivo sin fluctuaciones desde P20 a P30. Finalmente, a P40, la expresión génica decae en todos ellos, siendo similar a la de en etapas tempranas. *A priori*, las fluctuaciones de algunos factores neurotróficos en el PCD pueden en algunos casos ser muy distintas a las del WT (como *Igf-1* y *Vegf-B*); otras, sin embargo, son más parecidas (*Bdnf*) o incluso casi idénticas (*Vegf-A*).

Tras esta primera observación, los datos se analizaron cuantitativamente usando el test de Kruskal-Wallis, seguido del análisis *post hoc* que nos permite crear subconjuntos homogéneos, es decir, que genera grupos de valores dependiendo de la similitud entre ellos. Comenzando por *Igf-1*, en los ratones WT existen tres grupos de valores de expresión génica distintos, que engloban una expresión alta a P30, una baja a P40 y una intermedia en las edades restantes ($p = 0,001$; Figura 15 A). Por su parte, en los PCD observamos cuatro grupos de valores ($p = 0,008$; Figura 15 E), siendo diferente la distribución de estos grupos: el pico más alto de expresión –observado a P20 en ratones WT–, pasa a encontrarse a P30 en ratones PCD. Además, el valor de P25 es relativamente mayor que en ratones WT.

Por otro lado, en el análisis de *Bdnf* en ratones WT encontramos dos grupos de valores, uno que aglutina las edades en las que existe menos expresión, P10, P15 y P40, y otro con las edades en las que encontramos una expresión mayor, P20, P25 y P30 ($p < 0,001$; Figura 15 B). En los ratones PCD observamos algo parecido: un grupo con las edades P10 y P15, en las que la expresión es baja, y otro con las edades en las que la expresión es mayor, P20, P25 y P30. Sin embargo, en este caso, tenemos un tercer grupo con la edad de P40, de valores intermedios ($p = 0,048$; Figura 15 F). En todo caso, en ambos genotipos, la expresión de *Bdnf* aparece como basal a P10-P15, luego aumenta en una meseta entre P20-P30, y finalmente se reduce a P40.

Por su parte, *Vegf-A* muestra resultados similares en ambos grupos experimentales: tanto en WT como en PCD podemos observar dos grupos de valores, uno en el que se encuentran P10 y P15, edades en las que la expresión es menor, y otro que engloba el resto, desde P20 a P40 ($p_{WT} < 0,001$, $p_{PCD} = 0,015$; Figura 15 C, G).

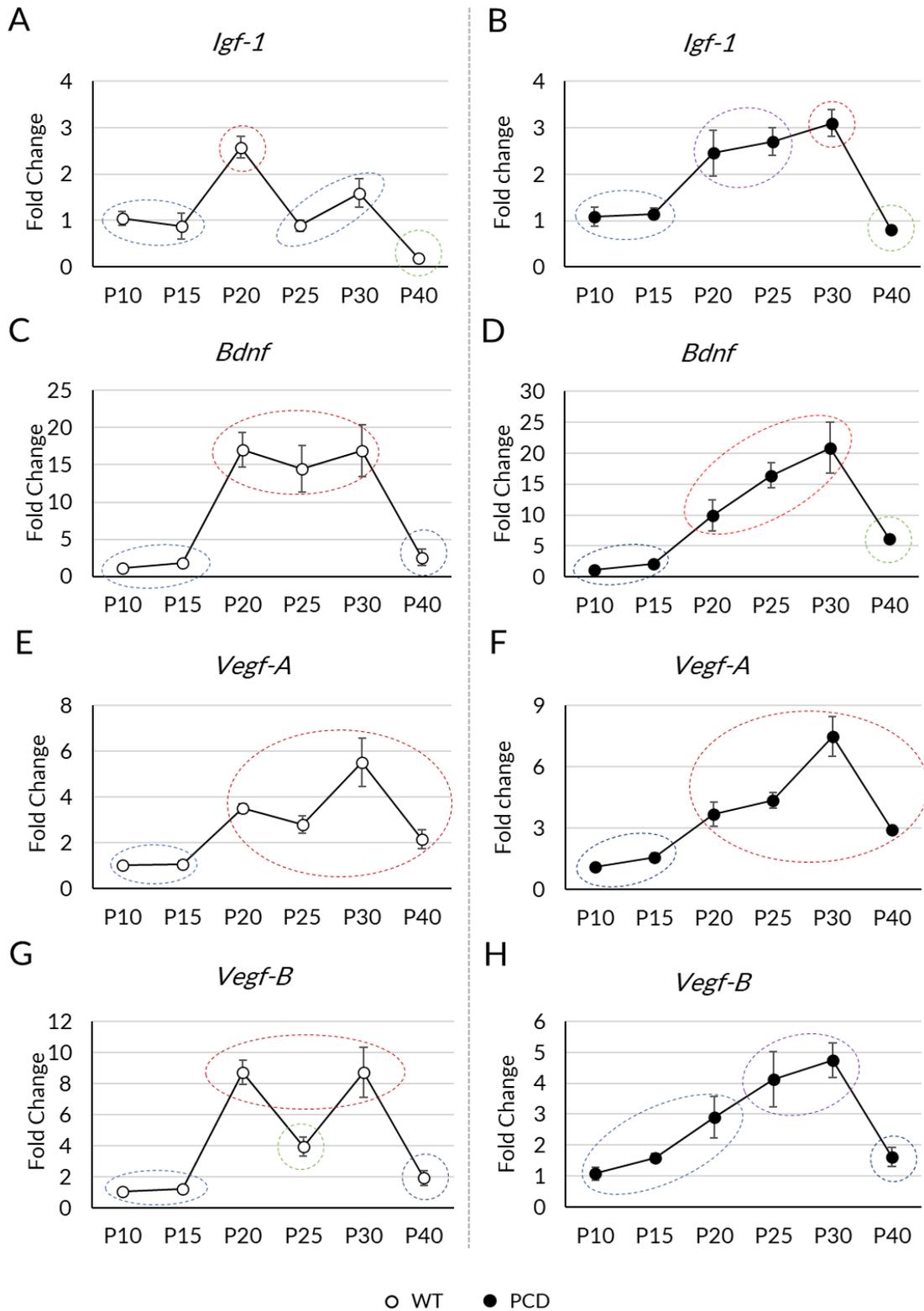
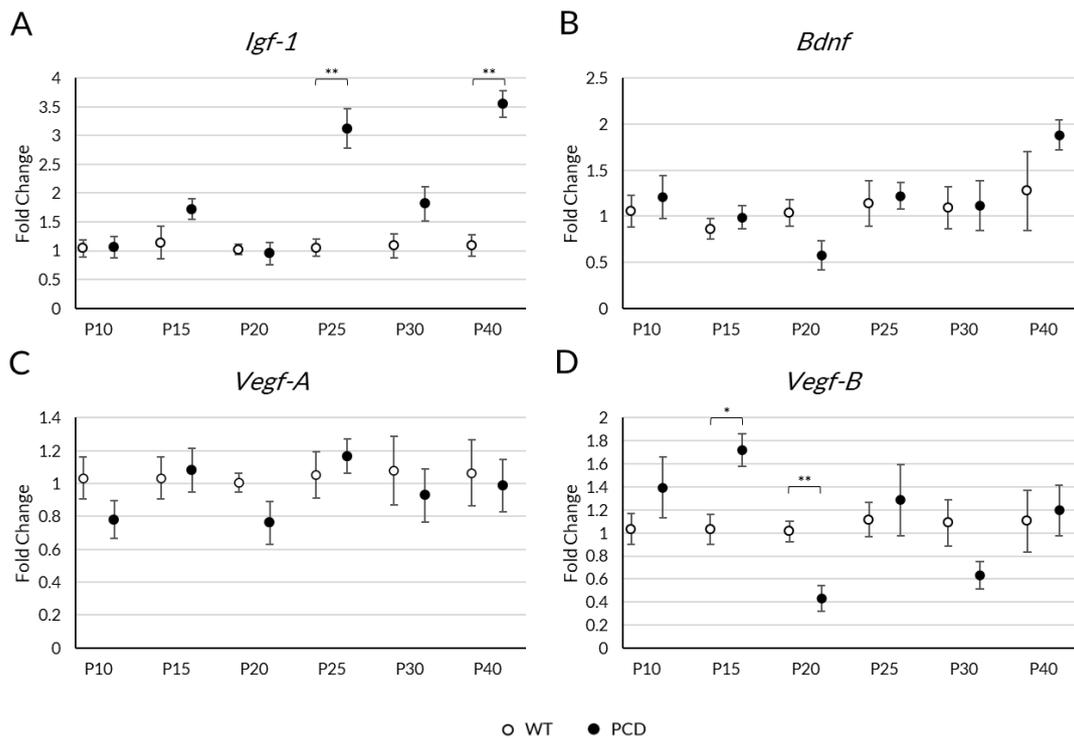


Figura 15. Análisis temporal de la expresión de *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* y *Vegf-B*. (A, E) Representación gráfica de la expresión de *Igf-1* en ratones WT (A) y PCD (E). (B, F) Representación gráfica de *Bdnf* en ratones WT (B) y PCD (F). (C, G) Representación gráfica de *Vegf-A* en ratones WT (C) y PCD (G). (D, H) Representación gráfica de *Vegf-B* en ratones WT (D) y PCD (H). Nótese las diferencias en el patrón de expresión temporal entre ratones WT (A-D) y PCD (E-H). Estas diferencias son especialmente notables en el caso de *Igf-1* y *Vegf-B*. Por su parte, los factores neurotróficos *Bdnf* y *Vegf-A* no mostraron diferencias aparentes entre los grupos experimentales. Los colores de las líneas punteadas representan los diferentes subgrupos de edades estadísticamente similares; aquellos con el mismo color tienen una expresión similar.

Finalmente, en *Vegf-B* vemos grandes cambios. Mientras que en WT existen tres grupos de valores de expresión génica ($p = 0,002$; Figura 15 D), en PCD encontramos dos ($p < 0,001$; Figura 15 H). Además, en WT hay dos picos de expresión a P20 y P30 (Figura 15 D), mientras que en los PCD la expresión máxima se mantiene en una pequeña meseta entre las edades de P20 y P30 (Figura 15 H).

Las diferencias detectadas entre ratones WT y PCD en la fluctuación temporal de la expresión génica de los distintos factores neurotróficos respalda el segundo análisis llevado a cabo: estudiar esta misma expresión a cada edad por separado, comparando los genotipos entre sí. En este nuevo grupo de análisis, la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney reveló diferencias estadísticamente significativas únicamente en dos de los factores neurotróficos analizados, *Igf-1* y *Vegf-B* (Figura 16 A, D). Con respecto a *Igf-1*, observamos un aumento estadísticamente significativo a P25 ($p = 0,010$) y a P40 ($p = 0,016$) en los ratones PCD con respecto a los WT (Figura 16 A). Por su parte, en el caso de *Vegf-B* observamos un aumento significativo a P15 en los ratones PCD ($p = 0,016$), seguido por una disminución en su expresión a P20 ($p = 0,004$; Figura 16 D). Por tanto, los cambios en *Vegf-B* parecen estar relacionados con el comienzo de la neurodegeneración (P15-P20), mientras que los cambios en *Igf-1* se encuentran en edades más avanzadas del proceso neurodegenerativo (P20-P40). El resto de los factores neurotróficos no mostraron diferencias entre genotipos en ninguna de las edades analizadas ($p > 0,05$; Figura 16 B y C).



Cambios en la expresión proteica de factores neurotróficos

Dado que la expresión de un gen no implica necesariamente su traducción en proteínas, tras el análisis de la expresión génica quisimos analizar la expresión proteica. Para ello, usamos la técnica ELISA, que nos da información cuantitativa de la producción proteica correspondiente a los factores neurotróficos analizados. Estos análisis se llevaron a cabo como una comprobación complementaria a los resultados obtenidos por qPCR. Por tanto, analizamos la expresión proteica en el cerebelo y en el plasma sanguíneo, comparando ratones WT y PCD en las edades principales de la neurodegeneración, P15 y P25. También comparamos la expresión proteica de ambos grupos experimentales en aquellas edades en las que observamos cambios a nivel génico (detalladas a continuación para cada factor). Los datos obtenidos de este análisis proteico se compararán con los del génico para una mejor comprensión de los resultados.

Comenzando con los factores neurotróficos que no mostraron cambios de expresión génica entre grupos experimentales, BDNF y VEGF-A, el análisis se realizó exclusivamente a P15 y P25.

La prueba estadística U de Mann-Whitney no mostró diferencias significativas ni en el cerebelo ni en el plasma sanguíneo en ninguna de las edades analizadas (Figura 17; $p > 0,05$), siendo similar a lo observado en los análisis mediante qPCR. Por tanto, descartamos estos factores neurotróficos como potenciales moléculas de uso terapéutico.

Figura 16. Análisis comparativo entre genotipos de la expresión génica de los diferentes factores neurotróficos. Representación gráfica de la expresión de *Igf-1* (A), *Bdnf* (B), *Vegf-A* (C) y *Vegf-B* (D) en ratones WT y PCD. Como se puede apreciar, los cambios se observan en *Igf-1* y *Vegf-B*, mientras que *Bdnf* y *Vegf-A* tienen una expresión similar entre genotipos. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

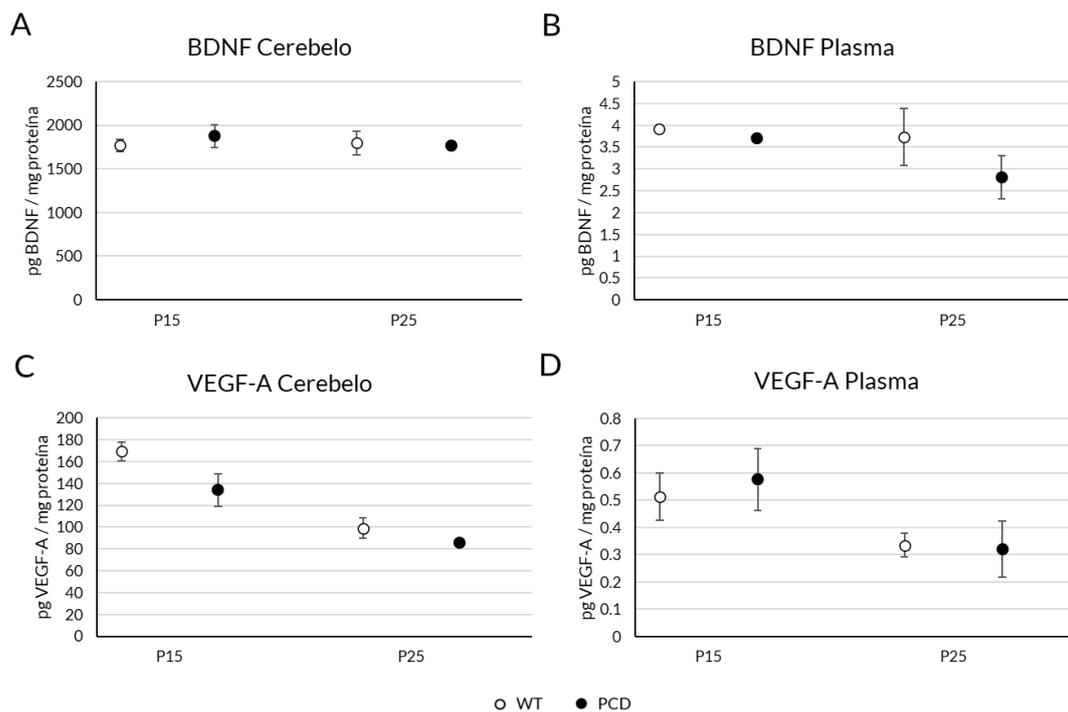


Figura 17. Análisis de la expresión proteica de BDNF y VEGF-A a P15 y P25. (A, B) Representación gráfica de la expresión proteica de BDNF en tejido cerebeloso (A) y en plasma sanguíneo (B) en ratones WT y PCD. (C, D) Representación gráfica de la expresión proteica de VEGF-A en tejido cerebeloso (C) y plasma sanguíneo (D) en los mismos grupos experimentales. Como se puede apreciar, no se observan cambios en ninguno de los factores neurotróficos analizados, ni en el cerebelo ni en el plasma, a ninguna de las edades.

El análisis de la expresión proteica de IGF-1 se realizó a P15, P25 y también a P40 (Figura 18 A, B), dado que el análisis de qPCR reveló diferencias en la expresión génica entre los grupos experimentales. Comenzando con P15, no observamos cambios en la expresión

proteica en ninguno de los tejidos analizados, lo que concuerda con la ausencia de diferencias en la expresión génica entre ratones WT y PCD a esta edad. A P25, observamos un aumento significativo de IGF-1 en PCD (Figura 18 A; $p = 0,029$) que también concuerda con la expresión génica en el cerebelo. Sin embargo, en sangre vemos una reducción de la expresión de IGF-1 (Figura 18 B; $p = 0,036$).

Por otro lado, a P40, no encontramos diferencias en la expresión proteica del cerebelo (Figura 18 A; $p > 0,05$), a pesar de que observamos un aumento en la expresión génica. No obstante, si encontramos un aumento de producción de la proteína en sangre (Figura 18 B; $p = 0,016$).

De forma análoga, el análisis proteico de VEGF-B se realizó a P15, P20 y P25 (Figura 18 C, D). Comenzando por P15, nuestros resultados mostraron un aumento significativo de la concentración de este factor neurotrófico en ratones PCD (Figura 18 C; $p = 0,042$), que concuerda con lo observado en el análisis génico en el cerebelo. Sin embargo, no encontramos diferencias en los niveles de proteína en plasma (Figura 18 D; $p > 0,05$). A P20 no existen cambios en la expresión proteica en tejido (Figura 18 C; $p > 0,05$), a pesar de que en los análisis mediante qPCR encontramos una reducción de expresión génica. Sin embargo, sí hay diferencias en el plasma, observando una reducción de los niveles proteicos de VEGF-B (Figura 18 D; $p = 0,042$). Por su parte, a P25 no observamos cambios de expresión proteica en ninguno de los tejidos analizados (Figura 18 C, D), coincidiendo con la ausencia de diferencias entre grupos experimentales a nivel génico.

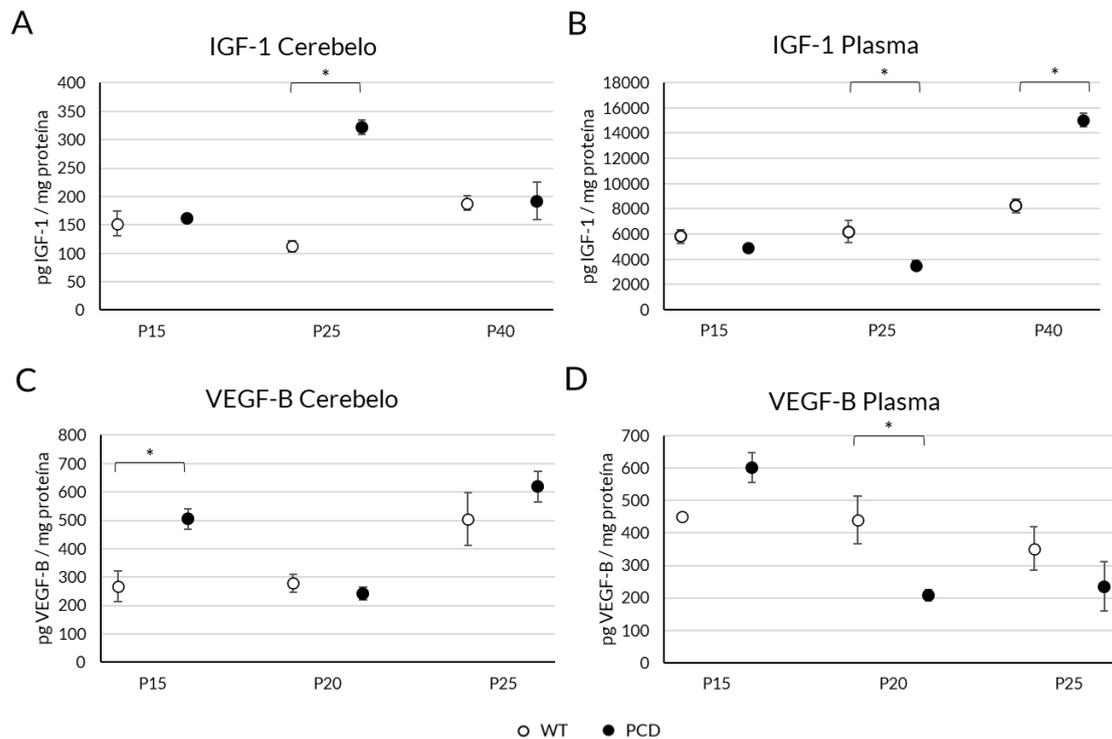


Figura 18. Análisis de la expresión proteica de IGF-1 y VEGF-B. (A, B) Representación gráfica de la expresión proteica de IGF-1 en tejido cerebeloso (A) y plasma sanguíneo (B) en ratones WT y PCD a P15, P25 y P40. (C- D) Representación gráfica de la expresión proteica de VEGF-B en tejido cerebeloso (C) y plasma sanguíneo (D) en ratones WT y PCD a P15, P20 y P25. Como se aprecia en las gráficas, se observan cambios en la expresión de ambos factores neurotróficos, coincidentes en gran medida con las variaciones en la expresión génica. * $p < 0,05$.

Por tanto, tras estos análisis hemos comprobado que existen fluctuaciones en la expresión tanto génica como proteica de IGF-1 y VEGF-B. Como comentaremos en profundidad en la sección de *Discusión*, los cambios parecen ser dependientes del momento de la degeneración. Así, VEGF-B se relaciona con etapas tempranas: P15, al comienzo de la preneurodegeneración, y P20, cuando las células de Purkinje comienzan a morir.

Por su parte, IGF-1 fluctúa cuando la degeneración ya está avanzada: a P25, cuando las células de Purkinje mueren de forma masiva, y P40, el momento en el que se da por finalizada la neurodegeneración cerebelosa, y solo sobrevive una cantidad residual de células de Purkinje.

Estos datos nos han permitido crear un diseño experimental para la administración de rhIGF-1 y rhVEGF-B. Las pautas de administración de estos factores se decidieron teniendo en cuenta sus variaciones de expresión entre genotipos, de forma que empezamos el tratamiento siempre cinco días antes del comienzo de dichas variaciones (detallados a continuación), es decir, a P20 para rhIGF-1 y a P10 para rhVEGF-B.

TRATAMIENTO CON rhIGF-1

El *screening* previo reveló diferencias entre genotipos en la expresión de IGF-1 que comenzaron a P25. Por ello, iniciamos el tratamiento con rhIGF-1 a P20, es decir, cinco días antes del comienzo de los cambios, y terminó a P30, momento en el que únicamente quedan unas pocas células de Purkinje aisladas en el cerebelo. Además, usamos un grupo de animales PCD tratados con NaCl como control para comprobar un posible efecto de la administración diaria (Morton *et al.*, 2001). En este apartado se detallará el efecto del tratamiento con rhIGF-1 administrado diariamente, sobre (1) el peso corporal de los animales, (2) el comportamiento motor, cognitivo y social, y (3) la supervivencia de las células de Purkinje.

Efecto del tratamiento en el peso corporal

Uno de los efectos de la neurodegeneración que sufren los ratones PCD es la pérdida de peso corporal (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978). Por ello, a lo largo de todo el tratamiento se ha monitorizado el peso de los ratones de los cuatro grupos experimentales usados: WT, PCD, PCD tratados con NaCl 0,9 % (PCD-NaCl) y PCD tratados con rhIGF-1 (PCD-rhIGF1), hasta el momento de su sacrificio.

Sin embargo, para simplificar, detallaremos el peso corporal de los animales a P25 y P30 (Figura 19). Dado que la administración de rhIGF-1 empieza a P20, estas dos edades nos dan información específica del efecto del tratamiento sobre el peso corporal, ya que dejamos un margen suficiente de cinco y diez días desde su comienzo. Además, las edades coinciden con los análisis del comportamiento de los animales. Por otro lado, estudios previos han mostrado que el peso de los ratones PCD comienza a diferir de los WT precisamente entre P20 y P25 (Mullen *et al.*, 1976).

Comenzando con P25, la prueba de Kruskal-Wallis detectó diferencias significativas entre grupos ($p = 0,021$). El test *post hoc* aplicado posteriormente para crear subconjuntos homogéneos reveló dos grupos claramente diferenciados: por un lado, los ratones WT y PCD-rhIGF1, y por otro, los grupos PCD y PCD-NaCl (Figura 19 A). A P30 observamos algo similar ($p = 0,015$), obteniendo asimismo dos grupos: el peso de los ratones tratados con rhIGF-1 fue similar a los ratones WT, al igual que el de los ratones PCD y PCD-NaCl (Figura 19 B).

Estos datos concuerdan con los publicados previamente en los que se demostraba un menor peso corporal en los ratones PCD con respecto a los animales WT (Mullen *et al.*,

1976; Landis y Mullen, 1978). Además, podemos confirmar que las inyecciones intraperitoneales diarias no afectan al peso corporal de los ratones, y que el rhIGF-1 parece recuperar el peso de los animales tratados hasta alcanzar valores normales, similares a los WT.

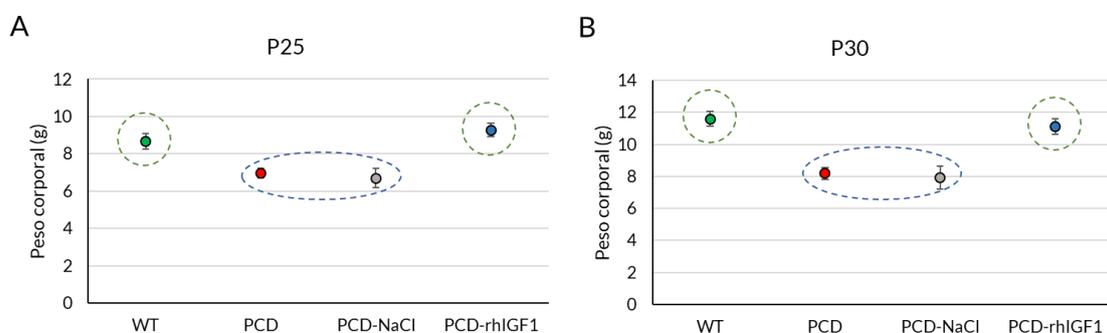


Figura 19. Efecto del tratamiento con rhIGF-1 en el peso corporal de los animales. Análisis del peso corporal a P25 (A) y P30 (B) de animales WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1. Nótese el efecto de la mutación y la recuperación del peso corporal de los ratones PCD tratados con rhIGF-1 tanto a P25 como a P30. Por su parte, la administración continua no provoca cambios en el peso corporal de los ratones PCD. Los colores de las líneas punteadas representan los diferentes subgrupos; aquellos con el mismo color tienen un valor estadísticamente similar.

Efecto del tratamiento en el comportamiento

Estudios previos en nuestro laboratorio demostraron alteraciones en el comportamiento motor, cognitivo y social en el ratón PCD (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Por este motivo, quisimos comprobar el efecto del tratamiento con rhIGF-1 en la realización de este tipo de tareas relacionadas con el funcionamiento del cerebelo. Para ello, evaluamos el comportamiento motor, cognitivo y social a P25 y P30 en animales WT, PCD y PCD-rhIGF1. También utilizamos el grupo de animales PCD-NaCl para comprobar un posible efecto de las inyecciones continuas.

Memoria de reconocimiento

Empleamos la prueba NOR para evaluar la memoria de reconocimiento, y analizamos tanto el porcentaje de tiempo que cada ratón pasa interactuando con un objeto conocido y uno novedoso, como el índice DI, tal y como se ha descrito en la sección de *Material y Métodos*. Puesto que los ratones son animales exploradores, tienden a dedicar más tiempo investigando los objetos novedosos. Cuando hay una disfunción, se pierde la capacidad de discriminar entre lo conocido y lo novedoso, haciendo que los animales pasen el mismo tiempo explorando ambos objetos (Ennaceur, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Comenzando con el porcentaje de tiempo de interacción con los dos objetos, encontramos los mismos resultados tanto a P25 como a P30. Mientras que los ratones WT dedicaron

mayor porcentaje de tiempo a interactuar con el objeto novedoso ($p_{P25} = 0,004$; $p_{P30} = 0,001$), en los ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1 no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre el tiempo dedicado a la exploración del objeto novedoso con respecto al familiar (Figura 20 A, B; $p > 0,05$).

Además, analizamos el DI como complemento de los resultados anteriores. Los ratones WT mostraron en todas las edades analizadas un DI positivo y, por tanto, poseen una buena capacidad de discriminación entre los objetos familiar y novedoso, o lo que es lo mismo, tienen un correcto funcionamiento de la memoria de reconocimiento. Sin embargo, los DI de los ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1 se encuentran próximos a 0 (Figura 20 C). El análisis estadístico de Kruskal-Wallis con la opción de crear subconjuntos homogéneos mostró diferencias en los ratones WT a todas las edades analizadas con respecto a los grupos de ratones PCD, independientemente del tratamiento (PCD, PCD-NaCl, PCD-rhIGF1).

Finalmente, llevamos a cabo el análisis del número de visitas totales a ambos objetos, con el fin de descartar una posible influencia de la ataxia de los ratones PCD en la realización de la prueba. Este análisis se realizó a P30, y, a pesar de que a esta edad los ratones PCD ya muestran una ataxia moderada, no detectamos cambios significativos entre los grupos experimentales (Figura 20 D; $p > 0,05$).

Por tanto, estos resultados muestran que el tratamiento con rhIGF-1 no mejora la memoria de reconocimiento en los ratones PCD. Además, en ningún caso encontramos diferencias entre los ratones PCD y PCD-NaCl, por lo que descartamos cualquier influencia –negativa o positiva– de la metodología de inyecciones continuas.

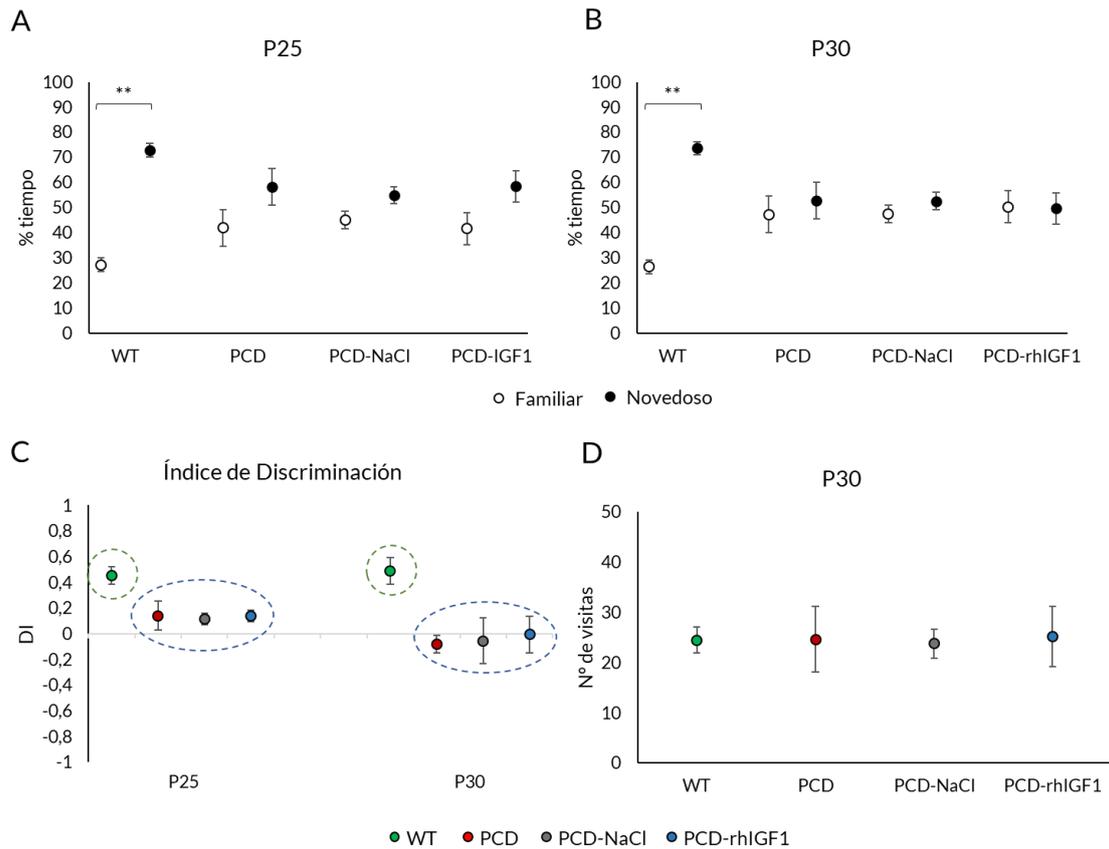


Figura 20. Efecto del tratamiento con rhIGF-1 en la memoria de reconocimiento a P25 y P30. (A-B) Cuantificación del porcentaje de tiempo dedicado a interactuar con el objeto novedoso y el familiar de los distintos grupos experimentales: WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1, a P25 (A) y P30 (B). (C) Representación gráfica del DI de los distintos grupos experimentales a P25 y P30. Los colores de las líneas punteadas representan los subgrupos con un índice similar. (D) Número total de visitas a ambos objetos a P30. Como se puede apreciar, ni la metodología de administración (pinchazos diarios con PCD-NaCl) ni el tratamiento con rhIGF-1 provocan cambios en el comportamiento de los ratones PCD. $** p < 0,01$.

Comportamiento social

Para evaluar el comportamiento social usamos la prueba de preferencia social, que nos aporta información acerca del porcentaje de tiempo en el que los ratones interactúan con un animal o un objeto, y el correspondiente SI (ver *Material y Métodos*). Si no existe ningún tipo de disfunción, los ratones, como animales sociales, tienden a pasar más tiempo con su congénere que con un objeto inanimado (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Los ratones WT mostraron en todas las edades analizadas una preferencia por la interacción con el otro animal, por lo que detectamos diferencias estadísticamente significativas en el tiempo que pasaron con este en comparación con el objeto (p P25 = 0,015; p P30 = 0,009). Sin embargo, los ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1 no mostraron preferencia por ninguna habitación, ya fuese la que contenía el ratón o el objeto, en ninguna de las edades analizadas (Figura 21 A y B; $p > 0,05$).

Por otro lado, analizamos el SI. Los ratones WT obtuvieron una puntuación positiva en todas las edades analizadas, indicando preferencia social (Figura 21 C). Sin embargo, los ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1 mostraron tanto a P25 como P30 valores cercanos a 0, lo que significa una ausencia total de preferencia social, siendo en ocasiones menor que 0 (Figura 21 C).

Los análisis estadísticos realizados mostraron dos grupos claramente diferenciados, uno que incluye a los ratones WT y otro en el que se encuentran todos los ratones PCD, independientemente del tratamiento (Figura 21 C).

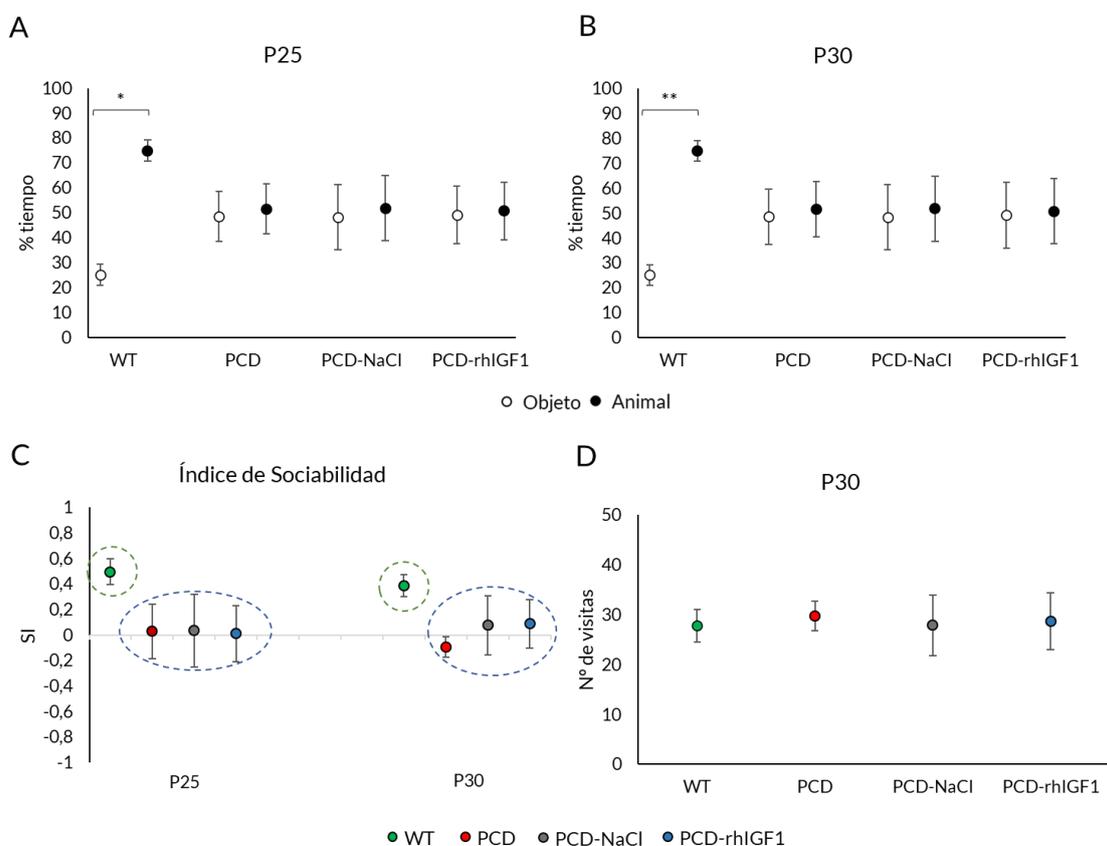


Figura 21. Efecto del tratamiento con rhIGF-1 en el comportamiento social a P25 y P30. (A, B) Cuantificación del porcentaje de tiempo dedicado a interactuar con el animal u objeto en los grupos experimentales WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1. (C) Representación gráfica del índice de sociabilidad para los diferentes grupos experimentales. Los colores de las líneas punteadas representan los subgrupos con un índice de sociabilidad similar. (D) Número total de visitas al animal y objeto a P30. Como se puede apreciar, el tratamiento con rhIGF-1 no mejora el comportamiento social en los ratones PCD. Por otro lado, no encontramos influencia de las inyecciones continuas. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Además, también comprobamos el efecto de la ataxia mediante el análisis del número de visitas totales a cualquiera de las dos habitaciones a P30 (Figura 21 D). De forma similar a la prueba anterior, no vimos diferencias entre el número de visitas tanto al animal como al objeto entre los diferentes grupos experimentales, descartando así cualquier influencia de los problemas de movimiento de los ratones mutantes.

Así pues, de manera análoga a la prueba anterior, descartamos la influencia del tratamiento con rhIGF-1 en el comportamiento social de los ratones PCD, así como la de la administración diaria.

Comportamiento motor

Mediante el uso de la prueba de la varilla giratoria o *Rotarod* medimos la habilidad y coordinación motora de los ratones. Para ello, usamos únicamente el parámetro de latencia a la caída, es decir, el tiempo que se mantiene el animal en la varilla antes de caer (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Pérez-Martín *et al.*, 2021). En este caso, realizamos el análisis estadístico ANOVA de una vía con medidas repetidas, detectando una interacción entre los factores “edad de la prueba” y “grupo experimental” ($p = 0,001$), que indica que ambos factores están influyendo a la vez en los resultados observados. Esto se debe a que las curvas de aprendizaje/ejecución de la prueba son diferentes entre genotipos (Figura 22). Mientras que los ratones WT mejoraron su comportamiento motor con la edad y se incrementó el tiempo de latencia a la caída ($p = 0,01$), en ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-IGF1 vemos una coordinación motora afectada ya desde P25, que desciende a P30 a valores de latencia cercanos a 0 ($p < 0,001$ para ambas edades y grupos experimentales). Esta ausencia de aprendizaje, e incluso la disminución en la coordinación motora con la edad se debe al efecto de la degeneración cerebelosa que afecta a los grupos experimentales PCD.

A continuación, para analizar más en profundidad estos datos, y con el fin de obtener la mayor cantidad de información posible en relación con los efectos del tratamiento, se analizaron las diferencias entre los grupos experimentales para cada edad en la que se realizó la prueba, utilizando el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. El análisis estadístico mostró diferencias entre los ratones WT y todos los grupos de PCD independientemente del tratamiento (Figura 22; $p < 0,01$ para ambas edades y grupos experimentales PCD).

Por tanto, la administración diaria no provoca cambios en la motricidad de los ratones PCD, independientemente de a qué grupo pertenecen. Además, podemos afirmar que el tratamiento con rhIGF-1 no mejora ni normaliza el comportamiento motor de los ratones PCD a ninguna de las edades analizadas.

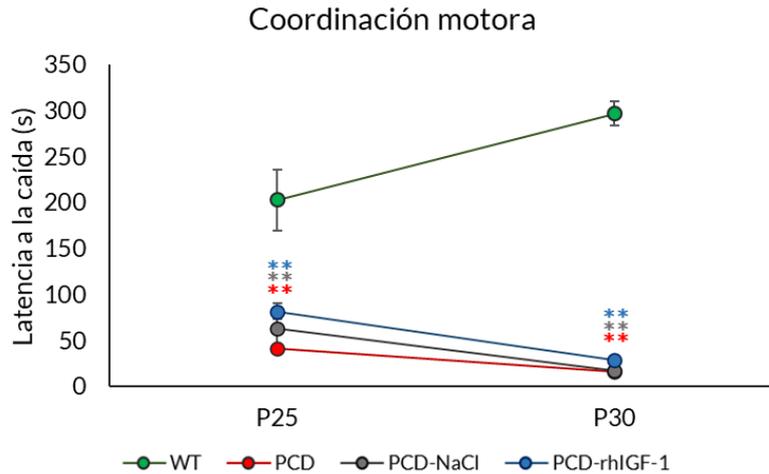


Figura 22. Efecto del tratamiento en el comportamiento motor a P25 y P30. Los animales WT obtuvieron valores de latencia a la caída de la prueba de *Rotarod* superiores a los otros grupos experimentales en todos los casos. No se encontraron diferencias entre ninguno de los grupos de ratones PCD, por lo que las inyecciones continuas no afectan a la coordinación motora, al igual que el tratamiento con rhIGF-1. ** $p < 0,01$, diferencias entre los grupos de animales PCD (según colores de la leyenda) y el grupo WT.

Efecto del tratamiento a nivel histológico

A pesar de no haber encontrado un efecto a nivel comportamental, decidimos evaluar posibles efectos neuroprotectores del tratamiento con rhIGF-1 en el cerebelo de los ratones PCD. Para ello, llevamos a cabo el análisis de la densidad de células de Purkinje a P30. Cualitativamente, ya podemos observar una marcada reducción en la densidad de estas neuronas en el cerebelo de los ratones PCD (Figura 23 B), PCD-NaCl (Figura 23 C) y PCD-rhIGF1 (Figura 23 D), con respecto a los ratones WT (Figura 23 A).

Los análisis cuantitativos se muestran atendiendo a la densidad lineal de células de Purkinje en el cerebelo entero (Figura 24 A, D), y analizando por separado los lóbulos I-IX (Figura 24 B, E) y el lóbulo X, debido a la neuroresistencia de este último (Figura 24 C; Wang y Morgan, 2007; Hernández-Pérez *et al.*, 2023). Además, para un análisis más preciso de los datos, se muestran las gráficas de la densidad de células de Purkinje en el cerebelo completo y en los lóbulos I-IX sin considerar a los ratones WT. En este sentido, realizamos un nuevo análisis estadístico de los datos de ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1, ya que, la gran disparidad de los datos entre ellos y los ratones WT podría enmascarar posibles resultados del tratamiento (Figura 24 D, E).

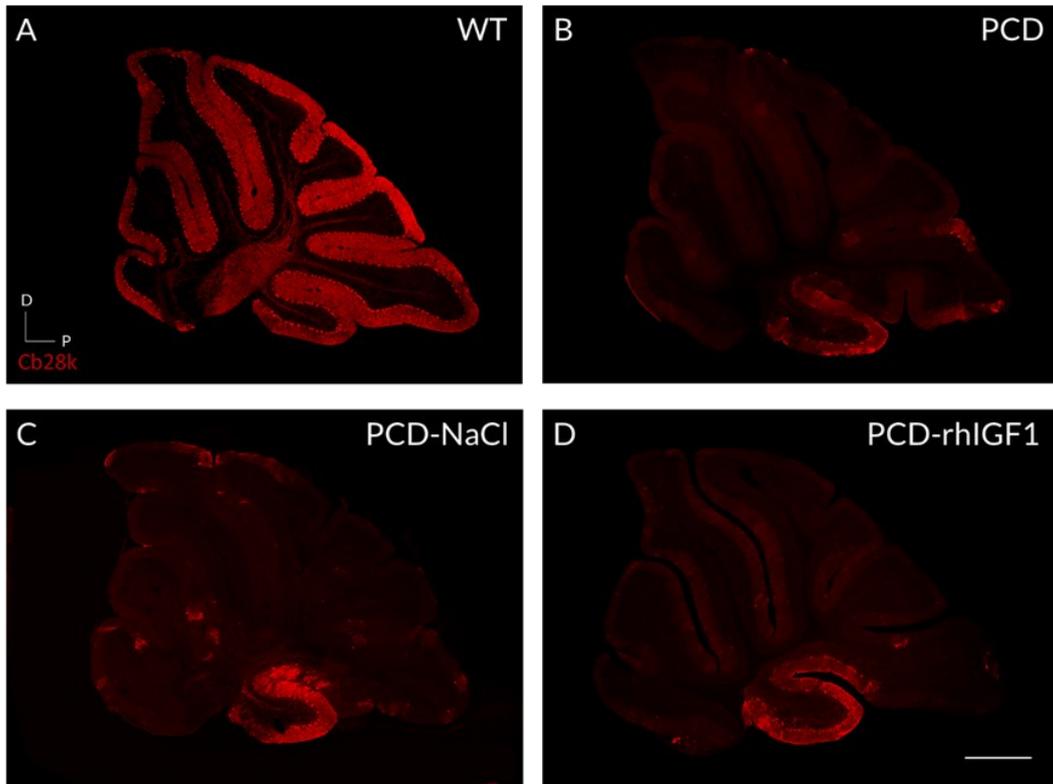


Figura 23. Efecto del tratamiento con rhIGF-1 a nivel histológico. Inmunofluorescencia de calbindina (Cb28k, en rojo) de secciones sagitales del vermis cerebeloso de ratones WT (A), PCD (B), PCD-NaCl (C) y PCD-rhIGF1 (D). Como se puede observar en las imágenes, los animales mutantes presentan una disminución sustancial del número de células de Purkinje en comparación con los WT, con la excepción del lóbulo X. Asimismo, no se aprecian diferencias cualitativas entre los ratones PCD sin tratar con respecto a los PCD tratados. Barra de escala 500 μ m.

En primer lugar, los ratones WT tienen una densidad celular mayor a la de los grupos PCD analizados –independientemente del tratamiento–, tanto en el análisis del cerebelo completo como en los lóbulos I-IX (Figura 24 A, B). Por otro lado, con relación al análisis del cerebelo completo, la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis reveló que no existen diferencias entre los ratones PCD y PCD tratados –tanto con rhIGF-1 como con NaCl– (Figura 24 A, D; $p > 0,05$), y, en todos los casos encontramos diferencias significativas con respecto a los ratones WT (Figura 24 A; $p_{WT-PCD} = 0,002$, $p_{WT-PCD-NaCl} = 0,002$; $p_{WT-PCD-rhIGF1} = 0,035$). Observamos algo similar cuando analizamos la densidad en los lóbulos I-IX: no encontramos diferencias entre grupos PCD independientemente del tratamiento ($p > 0,05$), pero sí cuando los comparábamos con WT (Figura 24 B, E; $p_{WT-PCD} = 0,008$, $p_{WT-PCD-NaCl} = 0,019$; $p_{WT-PCD-rhIGF1} = 0,014$). Finalmente, en el análisis del lóbulo X no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos experimentales (Figura 24 C; $p > 0,05$).

Así pues, el tratamiento con rhIGF-1 tampoco parece ejercer un efecto neuroprotector sobre la densidad de células de Purkinje en el cerebelo de los ratones PCD. Por otro lado, puesto que tampoco encontramos diferencias entre los ratones mutantes y los tratados con NaCl, concluimos que estos efectos no se deben a la administración continua del fármaco. Asimismo, el lóbulo X se muestra como una región neuroresistente no afectada por la mutación (o la administración de sustancias) a P30.

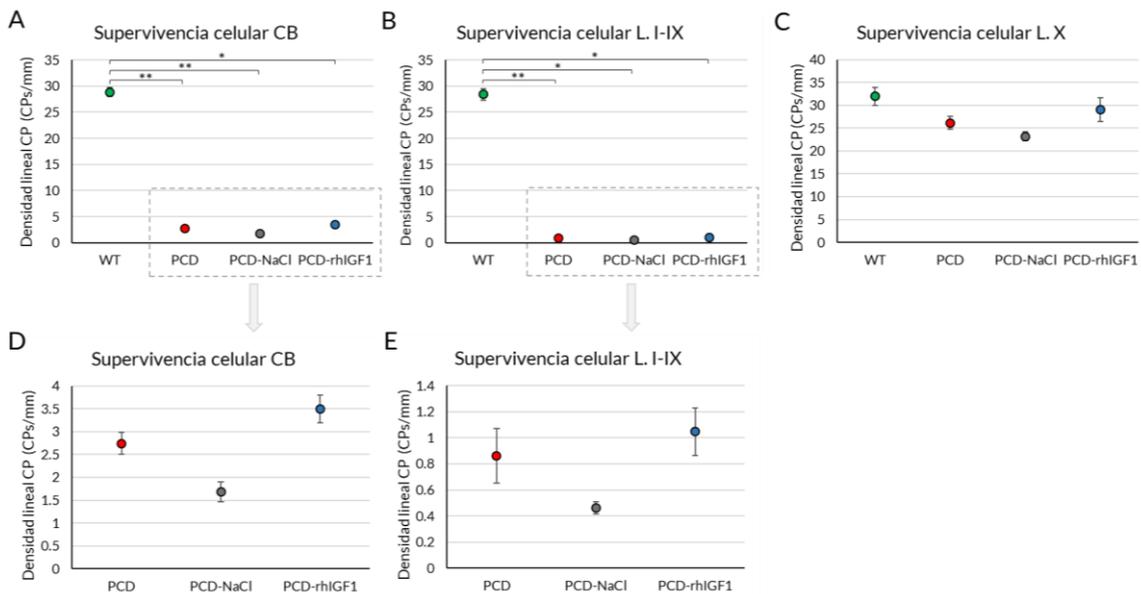


Figura 24. Cuantificación del efecto del rhIGF-1 en la supervivencia de las células de Purkinje a P30. (A-C) Representación gráfica de la supervivencia celular en el cerebelo completo (A), en los lóbulos I-IX (B) y en el lóbulo X (C) en los ratones WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhIGF1. (D, E) Representación gráfica de los datos anteriores sin los valores de los animales WT en el cerebelo completo (D) y en los lóbulos I-IX (E). Nótese que en todos los casos encontramos diferencias entre los grupos de PCD (tratados y sin tratar) en comparación con los WT. Entre los grupos de ratones PCD no encontramos diferencias significativas. CB, cerebelo; L., lóbulo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Teniendo en cuenta todos los datos anteriores, y puesto que no observamos mejoras ni en el comportamiento ni en la densidad celular en los ratones PCD-rhIGF1, podemos afirmar que este tratamiento no ejerce ningún tipo de efecto neuroprotector o beneficioso para los animales mutantes en las condiciones de tratamiento utilizadas. Por todo ello, no continuamos realizando más análisis utilizando este factor neurotrófico, y lo descartamos en principio como agente terapéutico de elección ante la degeneración cerebelosa del ratón PCD.

TRATAMIENTO CON rhVEGF-B I

El *screening* de factores neurotróficos mostró que existen diferencias de expresión de VEGF-B entre ratones WT y PCD, y que estas comienzan a P15. Por ello, abordamos el tratamiento con rhVEGF-B cinco días antes del comienzo de los cambios neurodegenerativos, a P10, y durante un periodo de 10 días, hasta P20. Además, usamos un nuevo set de animales PCD tratados con NaCl siguiendo el mismo patrón de administración, para comprobar el efecto de las inyecciones cada dos días (Morton *et al.*, 2001).

Por tanto, en este apartado, detallaremos los resultados obtenidos tras el tratamiento con rhVEGF-B administrado cada dos días, en el que se incluye el efecto del tratamiento sobre (1) el peso corporal, (2) el comportamiento motor, cognitivo y social, (3) la densidad de células de Purkinje supervivientes, y (4) el estado apoptótico de estas.

Efecto del tratamiento en el peso corporal

El procedimiento que llevamos a cabo para analizar el efecto del tratamiento con rhVEGF-B fue similar al detallado con el tratamiento anterior. Por ello, en primer lugar, monitorizamos el peso corporal de los ratones WT, PCD, PCD-NaCl y PCD tratados con rhVEGF-B (PCD-rhVEGF-B) a lo largo del tratamiento (P10-P20). En este caso, dado que el tratamiento comenzó antes que el de rhIGF-1, también incluimos en el análisis la edad de P17 además de P25 y P30, en coincidencia con las edades de los animales durante las pruebas de comportamiento realizadas para evaluar el efecto de este tratamiento.

Tras realizar el análisis de Kruskal-Wallis, vimos que existían diferencias entre genotipos únicamente a P25 y P30 (p P25 = 0,012; p P30 = 0,004). A continuación, realizamos el análisis *post hoc* que nos dio información sobre los subconjuntos presentes en nuestras muestras. A P17 únicamente encontramos un subconjunto en el que se encontraban todos los grupos experimentales (Figura 25 A), pero a P25 y P30 observamos dos grupos, ya que los ratones WT comienzan a ganar peso progresivamente y se separan del resto de los grupos experimentales (Figura 25 B, C). Por otro lado, el efecto de las inyecciones no provoca cambios en cuanto al peso corporal, ya que no encontramos diferencias entre los ratones PCD y PCD-NaCl.

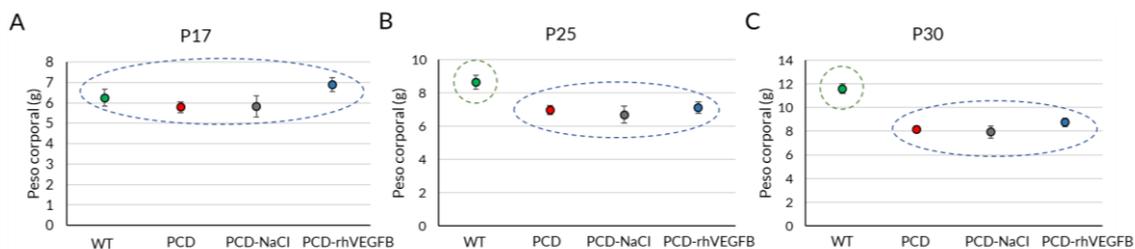


Figura 25. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B en el peso corporal de los animales. Análisis del peso corporal a P17 (A), P25 (B) y P30 (C) de animales WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB. Como se puede observar, a partir de P25 los ratones WT se separan estadísticamente del resto de ratones PCD (con y sin tratamiento), observándose una reducción notable en el peso corporal en los grupos de mutantes con respecto a los WT. Los colores de las líneas punteadas representan los diferentes subgrupos; aquellos con el mismo color tienen un peso corporal similar.

Una vez más, estos datos concuerdan con los publicados previamente con respecto a la pérdida de peso corporal en los ratones PCD (Mullen *et al.*, 1976). Sin embargo, en nuestro caso, podemos aportar que el tratamiento con rhVEGF-B no recupera el peso corporal de los ratones mutantes, sino que se mantiene similar al de los ratones PCD sin tratar.

Efecto del tratamiento en el comportamiento

De forma paralela al caso de rhIGF-1, comprobamos el efecto del tratamiento con rhVEGF-B sobre el comportamiento motor, cognitivo y social a lo largo del tratamiento (P17, P25 y P30) en animales WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGF-B.

Memoria de reconocimiento

Para evaluar la memoria de reconocimiento realizamos el test NOR, que, de la misma forma que en el tratamiento anterior, nos aporta información sobre el porcentaje de tiempo que cada animal interactúa con el objeto novedoso y el familiar, y el índice DI. Comenzando por el primer análisis, a P17 observamos que todos los grupos experimentales se comportaban de forma similar, ya que pasaban la mayor parte del tiempo explorando el objeto novedoso (Figura 26 A; $p_{WT} = 0,001$; $p_{PCD} = 0,003$; $p_{PCD-NaCl} < 0,001$; $p_{PCD-rhVEGFB} < 0,001$). Sin embargo, a P25 y P30 los animales PCD y PCD-NaCl no mostraron preferencia por ninguno de los objetos, por lo que no encontramos diferencias significativas entre el tiempo dedicado a la exploración del objeto novedoso con respecto al familiar (Figura 26 B, C; $p > 0,05$). Por el contrario, tanto a P25 como a P30, los ratones PCD-rhVEGFB mostraban una preferencia por la interacción con el objeto novedoso, observando un comportamiento similar a los ratones WT (Figura 26 B, C; P25: $p_{WT} = 0,004$; $p_{PCD-rhVEGFB} = 0,001$; P30: $p_{WT} = 0,002$; $p_{PCD-rhVEGFB} = 0,003$).

Por otro lado, analizamos el DI (Figura 26 D). A P17 observamos que todos los grupos experimentales analizados tenían valores positivos, es decir, que poseen una correcta capacidad de discriminación entre los objetos familiar y novedoso, o lo que es lo mismo, a esta edad observamos un correcto funcionamiento de la memoria de reconocimiento. Sin embargo, a P25 y P30, esto cambia. Los ratones PCD y PCD-NaCl tienen unos valores próximos a 0, por lo que no muestran preferencia por ninguno de los objetos. Por el contrario, los ratones PCD-rhVEGFB siempre se encontraban en valores positivos, de forma muy similar a lo observado en ratones WT. El análisis estadístico Kruskal-Wallis con la prueba *post hoc* que nos permite crear grupos homogéneos reveló que a P17 no existen diferencias entre los grupos experimentales, ya que observamos un único grupo. Sin embargo, a P25 y P30 los datos se separan organizándose en dos grupos: uno en el que encontramos a los ratones WT y PCD-rhVEGFB, ocupando valores positivos y, por tanto, discriminando entre objetos, y otro en el que se encuentran PCD y PCD-NaCl, en los que los valores están próximos a 0, por lo que no poseen capacidad de discriminación (Figura 26 D).

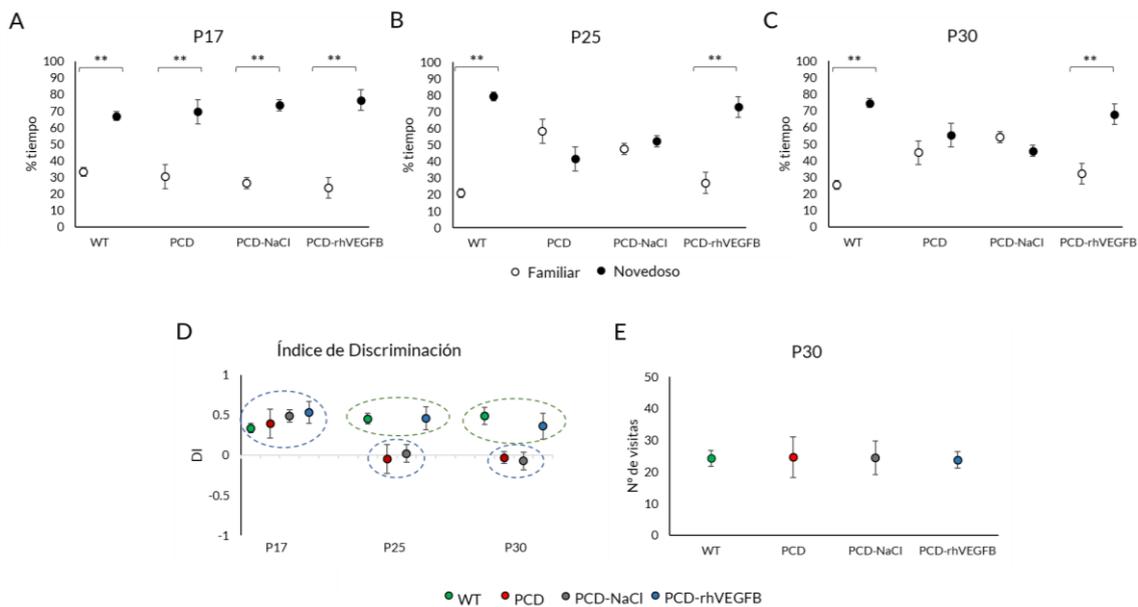


Figura 26. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B en la memoria de reconocimiento a P17, P25 y P30. (A-C) Cuantificación del porcentaje de tiempo dedicado a interactuar con el objeto novedoso y el familiar de los distintos grupos experimentales: WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB a P17 (A), P25 (B) y P30 (C). (D) Representación gráfica del índice de discriminación de los distintos grupos experimentales a P17, P25 y P30. Las líneas de puntos con diferentes colores rodean a los subgrupos con un índice de discriminación similar. (E) Número total de visitas a ambos objetos a P30. Nótese que el tratamiento con rhVEGF-B mejora la memoria de reconocimiento en los ratones PCD a todas las edades analizadas. Además, el procedimiento del tratamiento continuo (PCD-NaCl) no provoca cambios en el comportamiento, siendo similar a los ratones PCD. ** $p < 0,01$.

Además, también se analizó el número de visitas totales a ambos objetos a P30 con el fin de detectar algún tipo de influencia de la ataxia de los ratones mutantes en la realización de la prueba. De nuevo, no detectamos ninguna diferencia significativa entre los cuatro grupos experimentales ($p > 0,05$), a pesar de que a esta edad los ratones PCD ya muestran una ataxia moderada debido a la degeneración cerebelosa (Figura 26 E).

Por todo ello, este segundo tipo de metodología para una administración continua tampoco provoca cambios comportamentales en los ratones PCD, ya que no observamos diferencias entre los ratones PCD y PCD-NaCl. Además, el tratamiento con rhVEGF-B normaliza la memoria de reconocimiento en los ratones mutantes PCD, siendo similar a los ratones WT en todas las edades analizadas.

Comportamiento social

El comportamiento social se evaluó mediante la prueba de preferencia social, que nos da información acerca del tiempo que cada animal dedicó a la interacción con otro ratón o con un objeto (Figura 27 A-C), y el índice SI (Figura 27 D). Una vez más, los ratones WT mostraron una preferencia social en todas las edades analizadas (p P17 = 0,000; p P25 = 0,006; p P30 = 0,004). Por otro lado, los ratones PCD y PCD-NaCl no mostraron preferencia en ninguna de las edades analizadas, por lo que no encontramos diferencias significativas entre el tiempo de visita al otro animal o al objeto ($p > 0,05$). Sin embargo, los ratones tratados con rhVEGF-B mantuvieron la preferencia social de forma similar a los ratones WT en todas las edades analizadas, observando un mayor tiempo dedicado a la interacción con el animal con respecto al objeto (Figura 27 A-C; p P17 = 0,000; p P25 = 0,005; p P30 = 0,001).

En cuanto al SI, los ratones PCD y PCD-NaCl mostraron valores próximos a 0 en todas las edades analizadas (Figura 27 D). Sin embargo, en los ratones WT y PCD-rhVEGFB los valores de SI fueron siempre positivos, encontrando dos grupos homogéneos claramente identificables (análisis de Kruskal-Wallis y su prueba *post hoc* correspondiente): por un lado, los ratones WT y PCD-rhVEGFB, y, por otro lado, los ratones PCD y PCD-NaCl.

En cuanto al número de visitas, no detectamos diferencias entre los grupos experimentales analizados, por lo que la ataxia de los ratones mutantes tampoco interfiere en la realización de esta prueba (Figura 27 E; $p > 0,05$).

De forma análoga a la memoria de reconocimiento, el tratamiento con rhVEGF-B previene las alteraciones sociales observadas en los ratones PCD en todas las edades analizadas, por lo que observamos un efecto neuroprotector de esta sustancia a este nivel comportamental.

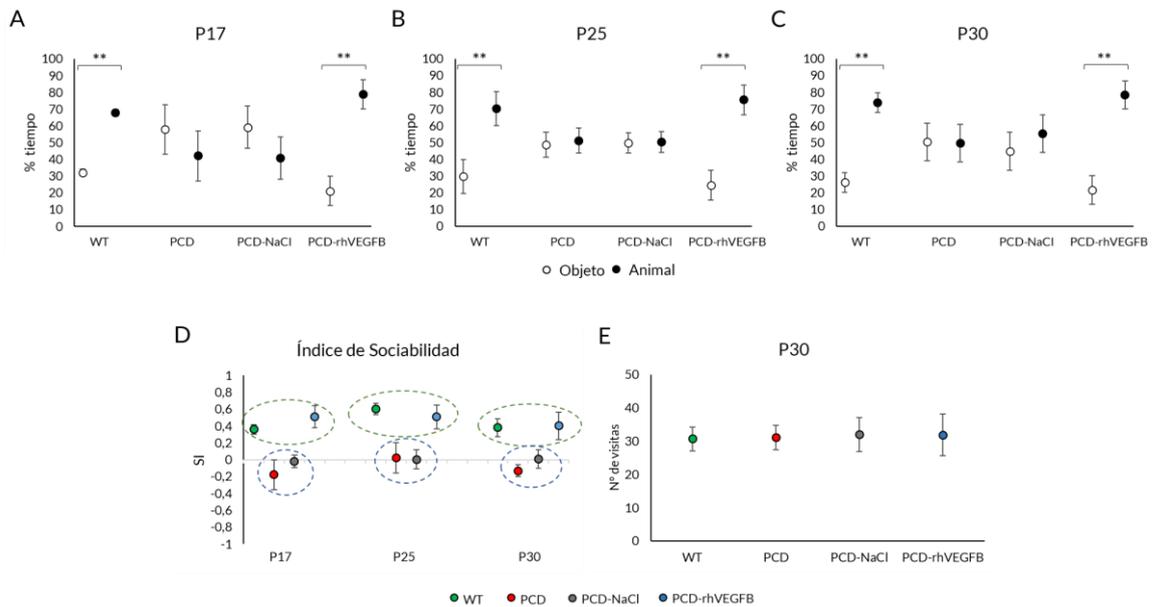


Figura 27. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B en el comportamiento social a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD. (A-C) Cuantificación del porcentaje de tiempo explorando el animal o el objeto en los grupos experimentales WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB. (C) Representación gráfica del índice de sociabilidad para los diferentes grupos experimentales. Las líneas de diferentes colores representan los subgrupos con un índice de discriminación similar (D) Número total de visitas al animal y al objeto a P30. Como se puede apreciar, el tratamiento con rhVEGF-B mejora el comportamiento social en los ratones PCD. Por su parte, las inyecciones cada dos días solamente con vehículo no provocan cambios en el comportamiento social. ** $p < 0,01$

Comportamiento motor

De nuevo, la habilidad y coordinación motoras de los ratones se evaluaron mediante la prueba de varilla giratoria o *Rotarod*. El análisis estadístico ANOVA de una vía con medidas repetidas mostró una interacción entre los factores “edad de la prueba” y “grupo experimental” ($p < 0,001$). Una vez más, esta interacción se debe a la disparidad de datos entre genotipos. En primer lugar, los ratones WT mejoran su comportamiento con la edad, aumentando el tiempo de latencia a la caída ($p < 0,001$), mientras que los ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB no muestran una mejora con la edad debida al aprendizaje, sino una disminución en el tiempo que se mantuvieron en la varilla antes de caer presumiblemente debida al avance de la neurodegeneración ($p_{PCD} < 0,001$; $p_{PCD-NaCl} = 0,013$; $p_{PCD-rhVEGFB} = 0,021$).

A continuación, realizamos el análisis estadístico para cada edad, con el fin de obtener la mayor cantidad de información posible que nos permita conocer el efecto del tratamiento. En este sentido, el test de Kruskal-Wallis, mostró que el comportamiento motor de los diferentes grupos experimentales diverge entre genotipos. En primer lugar, el comportamiento de los grupos PCD y PCD-NaCl ya difiere de lo observado en ratones WT desde P17, observándose diferencias significativas en todas las edades analizadas (Figura 28; $p < 0,001$ para ambos grupos experimentales y edades con respecto a WT). Sin embargo, la coordinación motora de los animales tratados con rhVEGF-B fue similar a los ratones WT a P17, donde no observamos diferencias significativas ($p > 0,05$), pero sí con los ratones PCD (Figura 26; $p > 0,001$).

A partir de P25 vemos como la capacidad motora de los ratones PCD-rhVEGF-B empeora, por lo que comenzamos a encontrar diferencias con los animales WT ($p_{P25} = 0,016$; $p_{P30} = 0,001$, p valor PCD-VEGF-B con respecto a ratones WT). A pesar de ello, los animales PCD-rhVEGF-B realizaron mejor la prueba a P25 y P30 en comparación con los ratones mutantes que no recibieron tratamiento (Figura 28), y encontramos diferencias significativas con estos ($p_{P25} = 0,023$; $p_{P30} = 0,002$ p valor con respecto a ratones PCD). Por su parte, no observamos diferencias entre los ratones PCD y PCD-NaCl ($p > 0,05$), por lo que tampoco parece existir un efecto de este tipo de administración continua en el comportamiento motor (Figura 28).

De forma similar que en el resto de las funciones cerebelosas evaluadas, el tratamiento con rhVEGF-B mejora la coordinación motora, al menos parcialmente, ya que los ratones tratados con este factor neurotrófico presentaron, en general, resultados que se encuentran a mitad de camino entre los obtenidos para los ratones WT y los PCD.

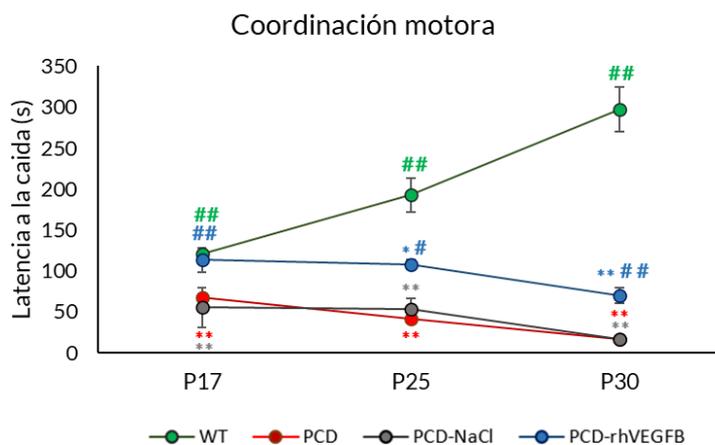


Figura 28. Efecto del tratamiento en el comportamiento motor a lo largo del proceso neurodegenerativo del PCD. Nótese que los ratones tratados con rhVEGF-B presentan un comportamiento motor similar a los animales WT a P17, e intermedio entre los animales WT y los otros PCD a P25 y P30. Por su parte, la administración cada dos días (NaCl) no provoca cambios en el comportamiento motor de los ratones PCD. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, diferencias entre los grupos animales PCD y el grupo WT; # $p < 0,05$ ## $p < 0,01$ para diferencias entre los grupos experimentales PCD-NaCl y PCD-rhVEGF-B y ratones PCD.

Efecto del tratamiento a nivel histológico

Con el fin de evaluar si la mejora en el comportamiento de los animales tratados con rhVEGF-B se debía a un efecto a nivel histológico, analizamos los cambios en la densidad de células de Purkinje a P30. Adicionalmente, dados los resultados obtenidos en la supervivencia neuronal a esta edad (ver a continuación), así como en la realización de las pruebas de comportamiento, repetimos este mismo análisis a P25. Además, realizamos un análisis de apoptosis a ambas edades, para lo cual se empleó la técnica TUNEL, que permite ver roturas en el DNA que se generan durante el proceso de muerte celular programada (ver *Material y Métodos*).

Análisis histológico a P30

La cuantificación de la supervivencia de las células de Purkinje se llevó a cabo a P30, en ratones WT, PCD y PCD-rhVEGFB. Además, añadimos el grupo experimental PCD-NaCl correspondiente a este tratamiento (Figura 29). Por otro lado, debido a la disparidad de los datos, al igual que con el tratamiento con rhIGF-1, se muestran los resultados en gráficas que engloban todos los grupos experimentales en el cerebelo completo (Figura 30 A), y separando los lóbulos I-IX (Figura 30 B) y X (Figura 30 C).

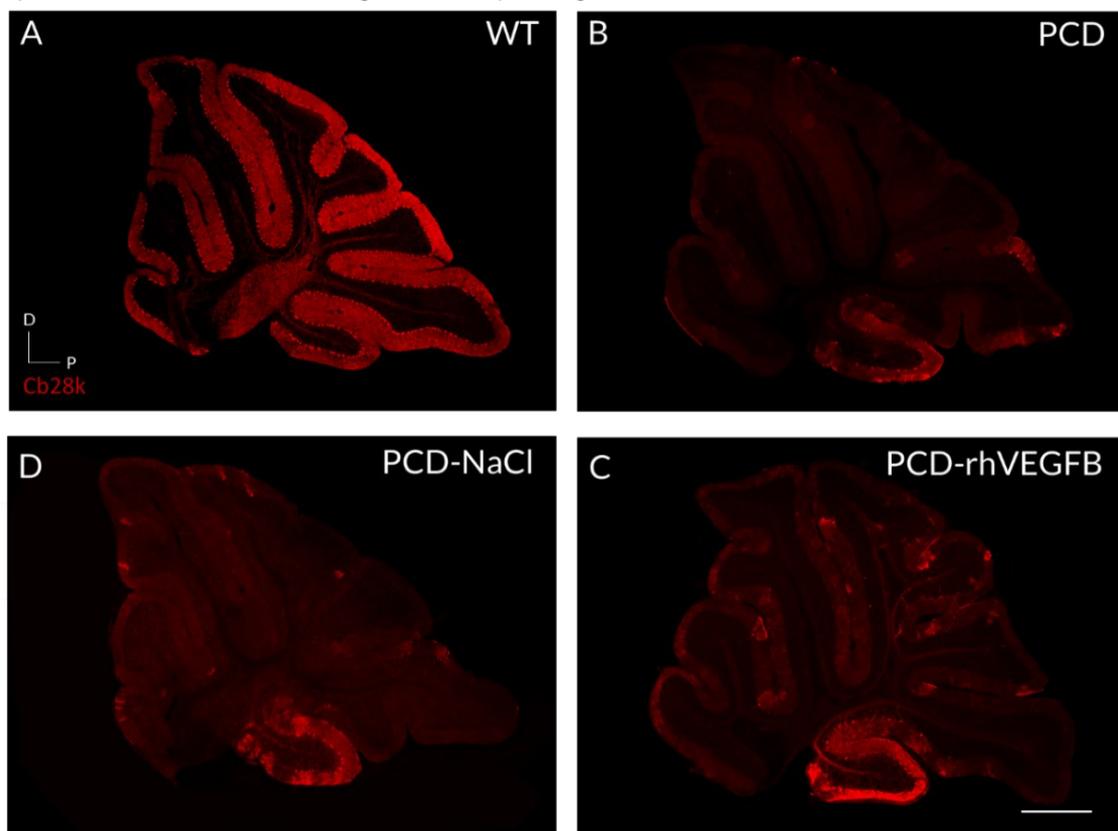


Figura 29. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B a P30 a nivel histológico. (A-D) Inmunofluorescencia de calbindina (Cb28k, en rojo) de secciones sagitales del vermis cerebeloso de ratones WT (A), PCD (B), PCD tratado con NaCl (C; PCD-NaCl) y PCD tratado con rhVEGF-B (D; PCD-rhVEGFB). Nótese el mayor número de neuronas en los ratones PCD-rhVEGFB con respecto al resto de grupos PCD. Barra de escala 500 μ m.

Asimismo, realizamos un nuevo análisis estadístico de los datos de ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB, puesto que la gran disparidad de los datos entre ellos y los ratones WT podría enmascarar los resultados obtenidos (Figura 30 D, E).

En el análisis del cerebelo completo (Figura 30 A), la densidad celular de los ratones WT difiere notablemente del resto de grupos experimentales PCD, en los que encontramos una marcada reducción ($p_{\text{PCD}} = 0,010$; $p_{\text{PCD-NaCl}} = 0,001$; $p_{\text{PCD-rhVEGFB}} = 0,008$; p *valor* respecto a WT). A pesar de ello, los ratones PCD-rhVEGFB mostraron una densidad celular algo mayor, con diferencias significativas con respecto a los ratones de los grupos PCD ($p = 0,009$) y PCD-NaCl (Figura 30 A, D; $p = 0,006$). La reducción observada en los animales PCD -ya sea sin tratar o tratados con NaCl o rhVEGF-B-, se debe mayoritariamente a la neurodegeneración observada en los lóbulos I-IX, donde vemos diferencias significativas entre estos y los ratones WT (Figura 30 B; $p_{\text{PCD}} = 0,001$; $p_{\text{PCD-NaCl}} = 0,016$; $p_{\text{PCD-rhVEGFB}} = 0,012$; p *valor* respecto a WT). Cuando realizamos el análisis únicamente con los grupos PCD en los lóbulos I-IX, confirmamos los resultados anteriores: los ratones PCD y PCD-NaCl tienen una densidad celular similar ($p > 0,05$); al mismo tiempo, ambos grupos mostraron diferencias con respecto a los ratones PCD-rhVEGFB ($p_{\text{PCD}} = 0,006$; $p_{\text{PCD-NaCl}} = 0,009$), y se observa una mayor densidad de células en los ratones tratados en comparación con los ratones PCD (Figura 30 E). Por otro lado, no encontramos diferencias entre los grupos experimentales en el lóbulo X, lo que confirma que es una estructura altamente neuroresistente (Figura 30 C; $p > 0,05$).

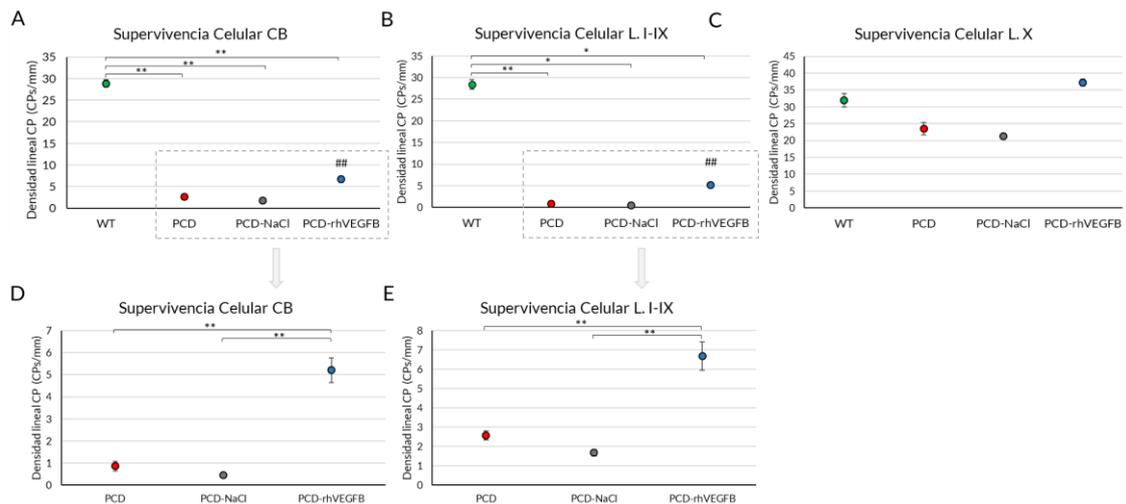


Figura 30. Cuantificación del efecto del rhVEGF-B en la supervivencia de las células de Purkinje a P30. (A-C) Representación gráfica de la supervivencia celular en el cerebelo completo (A), en los lóbulos I-IX (B) y en el lóbulo X (C) en los ratones WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB. (E, F) Representación gráfica de la supervivencia celular sin los datos de los ratones WT en el cerebelo completo (D) y en los lóbulos I-IX (E). Nótese el efecto neuroprotector de rhVEGF-B, observando un aumento de la densidad de células de Purkinje con respecto los animales PCD sin tratar. Por otro lado, descartamos los efectos de la administración continua sobre la densidad celular. CB, cerebelo; L., lóbulo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ para diferencias entre los grupos experimentales PCD y el grupo WT; ## $p < 0,001$ para diferencias entre los grupos experimentales PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB y ratones PCD.

A continuación, vistos los resultados obtenidos tras la administración de rhVEGF-B, analizamos las células apoptóticas atendiendo al número de células TUNEL positivas en la capa de células de Purkinje respecto a su longitud, es decir, cuantificamos la densidad lineal. Todas las células que se incluyeron en la cuantificación tenían una morfología típica: tamaño reducido, núcleo desorganizado y marcaje positivo para TUNEL (Figura 31 A-C). Dado que el sistema de administración (inyecciones cada dos días) no mostró efecto alguno en ningún caso de los anteriores, decidimos excluir este grupo experimental de este nuevo análisis, para simplificarlo. La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los ratones PCD-rhVEGF-B y los grupos WT y PCD, tanto en el análisis del cerebelo completo (Figura 31 G; $p < 0,001$ en ambos casos), como en la cuantificación de los lóbulos I-IX (Figura 31 H; $p < 0,001$ para los dos grupos experimentales). Sin embargo, no encontramos diferencias entre los grupos PCD y WT ($p > 0,05$). Por su parte, el análisis del lóbulo X no mostró diferencias entre los grupos experimentales (Figura 31 I; $p > 0,05$).

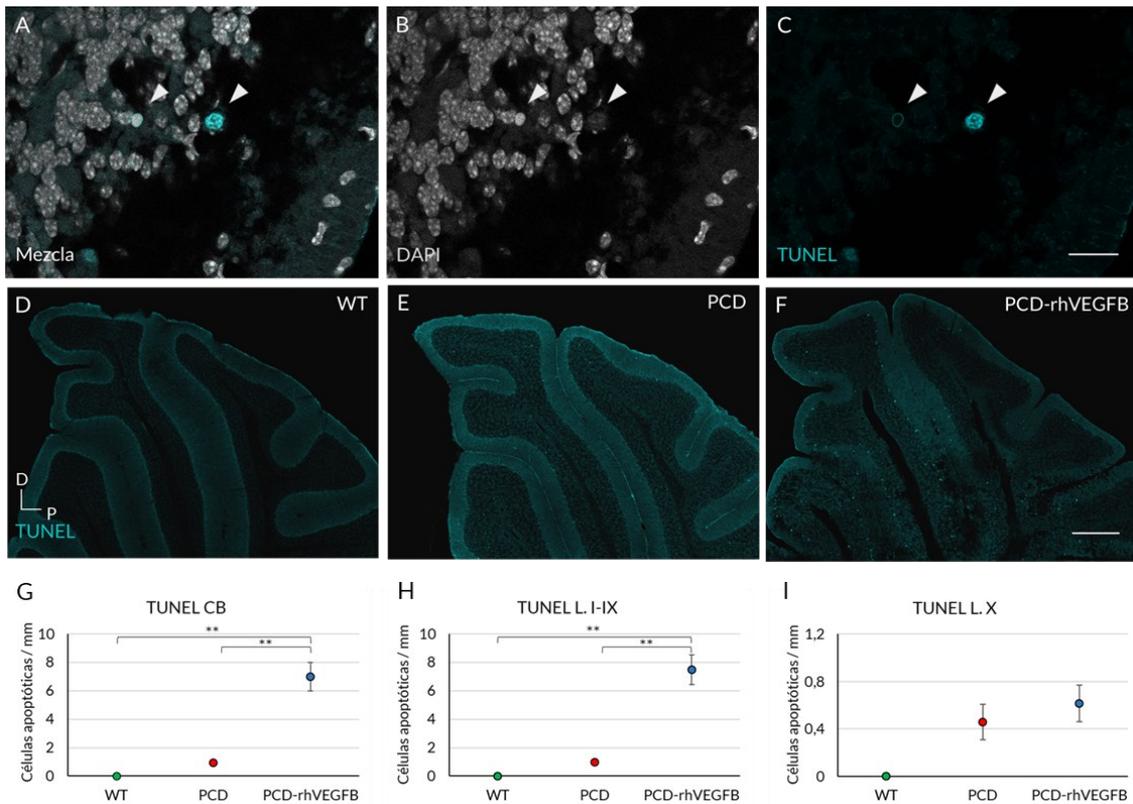


Figura 31. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B sobre la muerte celular programada a P30. (A-C) Morfología típica de células TUNEL positivas. (D-F) Marcaje de TUNEL en secciones sagitales de cerebelo en ratones WT (D), PCD (E) y PCD-rhVEGF-B (F). (G-I) Cuantificación de la densidad de células apoptóticas en el cerebelo completo (G), en los lóbulos I-IX (H) y en el lóbulo X (I) de ratones WT, PCD y PCD-rhVEGF-B. Nótese el aumento de células apoptóticas en los ratones PCD-rhVEGF-B, siendo mayor que lo observado en ratones WT y PCD. CB, cerebelo; L, lóbulo. ** $p < 0,01$. Barra de escala 15 μm (A-C), 300 μm (D-F).

Estos resultados indican que el tratamiento con rhVEGF-B está produciendo un efecto neuroprotector parcial sobre las células de Purkinje, ya que encontramos una densidad celular intermedia entre los ratones WT y PCD, que se traduce en una mejora del comportamiento motor, cognitivo y social. Sin embargo, encontramos un aumento de las células apoptóticas en los ratones tratados con rhVEGF-B, posiblemente debido a la existencia de una densidad celular mayor. Para comprobar esta hipótesis, así como para dilucidar si la neuroprotección ejercida por el rhVEGF-B es mayor a edades más prematuras o es solo de tipo parcial, decidimos repetir todos estos análisis a P25.

Análisis histológico a P25

Tras el aumento de densidad celular observado a P30 en el cerebelo de los ratones tratados con rhVEGF-B, decidimos analizarlo a P25, ya que a esta edad también encontramos una recuperación total de la memoria de reconocimiento y el comportamiento social, y una parcial en la coordinación motora. La cuantificación de la supervivencia de las células de Purkinje se llevó a cabo en ratones WT, PCD y PCD-rhVEGFB (Figura 32). De forma similar al tratamiento anterior, realizamos la cuantificación en el cerebelo entero, englobando todos los lóbulos (Figura 32 D), así como analizando por separado los lóbulos I-IX (Figura 32 E) y el lóbulo X (Figura 32 F). Finalmente, siguiendo el principio de las tres erres, con el fin de utilizar el mínimo número de animales de experimentación (Russell y Burch, 1959), y puesto que no encontramos diferencias debidas a la administración continua cada dos días a P30, no utilizamos el grupo experimental PCD-NaCl a esta edad.

Cualitativamente observamos una densidad celular similar en ratones WT y PCD-rhVEGFB. Por su parte, los ratones PCD muestran una reducción notable del número de células de Purkinje (Figura 32 A-C).

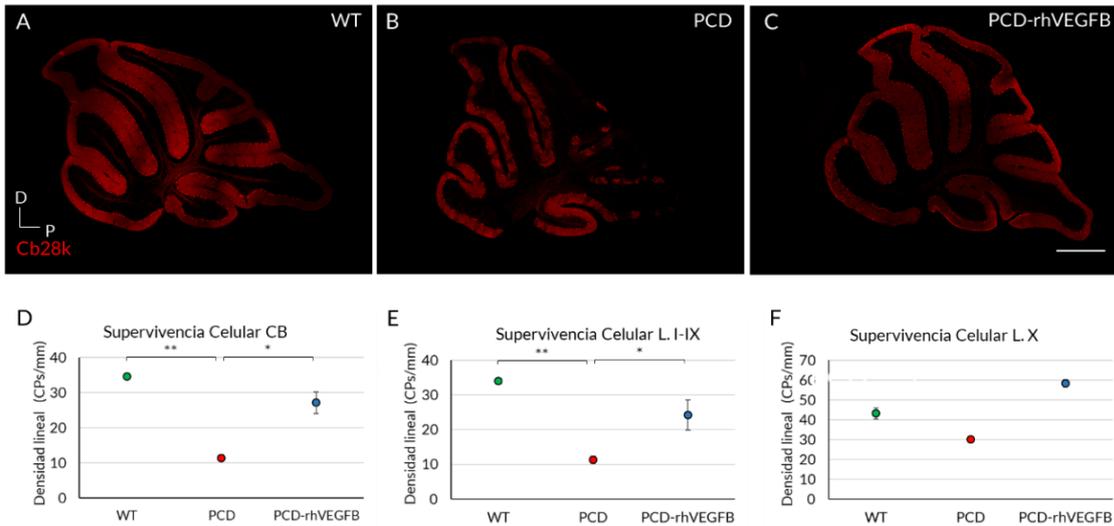


Figura 32. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B a P25 a nivel histológico. (A-C) Secciones sagitales de vermis cerebeloso marcadas con calbindina (C28k, rojo) en animales WT, PCD y PCD-rhVEGFB. (D-F) Cuantificación del efecto del tratamiento con rhVEGF-B en la supervivencia de las células de Purkinje en el cerebelo entero (D), en los lóbulos I-IX (E) y en el lóbulo X (F). Nótese el efecto neuroprotector de rhVEGF-B, ya que los ratones PCD tratados con él presentan la misma densidad de células de Purkinje que los ratones WT. CB, cerebelo; L, lóbulo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; Barra de escala 500 μm .

La prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis corroboró esta primera observación, ya que mostró una reducción en la densidad de células de Purkinje en el cerebelo completo en los ratones PCD con respecto a los ratones WT ($p = 0,002$) y PCD-rhVEGFB (Figura 32 D; $p = 0,035$), diferencias que se encontraban principalmente en los lóbulos I-IX (Figura 32 E; p WT = 0,002; p PCD-rhVEGFB = 0,011 p valor con respecto a PCD), ya que la densidad celular se mantiene similar en los tres grupos experimentales en el lóbulo X (Figura 32 F; $p > 0,05$). Además, en ningún caso encontramos diferencias significativas entre los ratones WT y PCD-rhVEGFB, por lo que, el tratamiento con rhVEGF-B detiene la muerte de las células de Purkinje, retrasándola por completo, al menos hasta P25.

A continuación, analizamos la apoptosis en el cerebelo de ratones WT, PCD y PCD-rhVEGFB (Figura 33). En este caso, la prueba de Kruskal-Wallis y sus correspondientes análisis *post hoc* mostraron diferencias significativas únicamente entre los grupos WT y PCD en el análisis del cerebelo completo (Figura 33 D; $p < 0,001$) y en los lóbulos I-IX (Figura 33 E; $p = 0,013$). Sin embargo, no encontramos diferencias entre los ratones WT y PCD-rhVEGFB ni entre los animales PCD y PCD-rhVEGFB ($p > 0,05$). Por su parte, el lóbulo X tampoco presentó diferencias significativas entre grupos experimentales (Figura 33 F; $p > 0,05$), a pesar de que en este lóbulo los valores de los ratones PCD tratados fueron idénticos a los WT, mientras que los correspondientes a los PCD sin tratamiento mostraron cierto incremento (Figura 33 F).

Estos resultados indican que el tratamiento con rhVEGF-B está produciendo un efecto neuroprotector sobre las células de Purkinje, ya que encontramos una densidad celular similar a la de los WT, que se asocia con una mejora en las funciones cerebelosas. Sin embargo, a pesar de que no frena por completo el daño del DNA y muerte celular, si lo hace parcialmente, ya que en los animales PCD-rhVEGFB encontramos un número intermedio de células TUNEL positivas entre ratones WT y PCD.

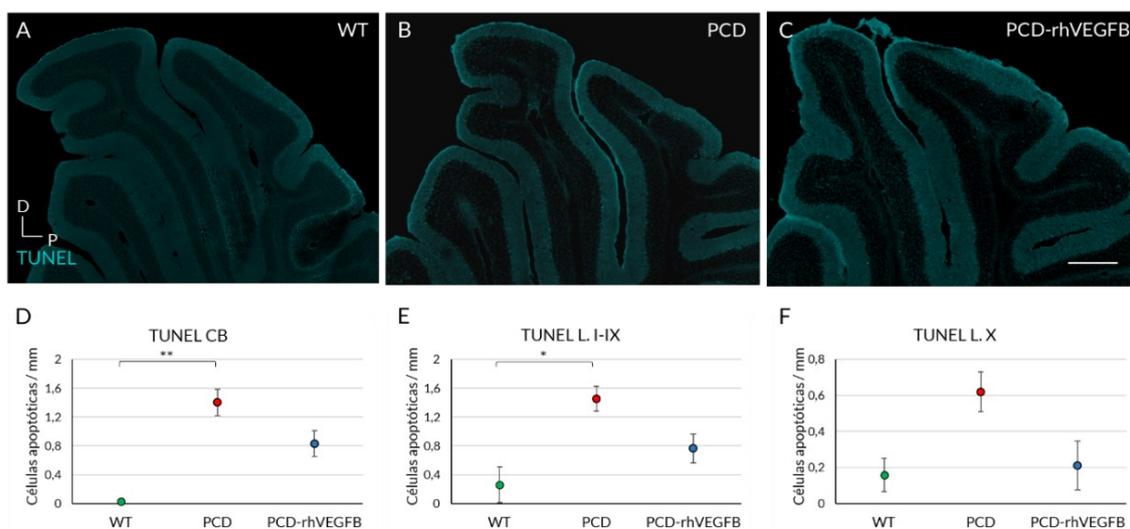


Figura 33. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B sobre la muerte celular programada a P25. (A-C) Marcaje de TUNEL de secciones sagitales de cerebelo en ratones WT (A), PCD (B) y PCD-rhVEGFB (C). (D-F) Cuantificación de la densidad de células apoptóticas en el cerebelo completo (D), en los lóbulos I-IX (E) y en el lóbulo X (F) de ratones WT, PCD y PCD-rhVEGFB. Nótese el efecto del rhVEGF-B, que reduce la densidad de células apoptóticas de los ratones PCD a un nivel intermedio entre los ratones mutantes sin tratar y los WT. CB, cerebelo; L., lóbulo* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Barra de escala 300 μm .

TRATAMIENTO CON rhVEGF-B II

Debido a la mejora observada tras el tratamiento con rhVEGF-B inyectado cada dos días, quisimos comprobar si un aumento en la cantidad administrada podría optimizar los resultados obtenidos. Por ello, decidimos tratar a un nuevo grupo de animales de forma diaria, desde P10-P20, asemejando la frecuencia de la administración a la pauta comúnmente con IGF-1 (ver *Introducción*). En este apartado se mostrarán los resultados obtenidos con este tratamiento sobre (1) el comportamiento y (2) la supervivencia de las células de Purkinje.

Efecto del tratamiento sobre el comportamiento

De forma similar a los casos anteriores, comprobamos el efecto de la administración diaria con rhVEGF-B mediante el uso de diferentes pruebas, que nos permiten analizar el comportamiento cognitivo, social y motor a lo largo del tratamiento (P17, P25 y P30) en animales WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-VEGF-B.

Comenzando con la prueba NOR (Figura 34 A-D), analizamos el porcentaje de tiempo que interactúan los distintos grupos animales con el objeto novedoso y el familiar. Además, también estudiamos el índice DI y el número de visitas totales a ambos objetos. En primer lugar, a P17 observamos un comportamiento similar en todos los grupos animales, ya que estos pasan la mayor parte del tiempo interactuando con el objeto novedoso (Figura 34 A; $p_{WT} < 0,001$; $p_{PCD} = 0,004$; $p_{PCD-NaCl} < 0,001$; $p_{PCD-rhVEGFB} < 0,001$). A P25 y P30, como en los otros tipos de administración, encontramos en los ratones WT una preferencia por la interacción con el objeto novedoso (Figura 34 B, C; $p_{P25} = 0,009$; $p_{P30} < 0,01$).

Sin embargo, en los ratones PCD –independientemente del tratamiento– no encontramos diferencias significativas entre el tiempo de exploración del objeto novedoso y familiar (Figura 34 B, C; $p > 0,05$). Por otro lado, analizamos el DI (Figura 34 D). A P17, todos los grupos experimentales muestran un DI positivo, es decir, poseen una correcta capacidad de discriminación. Sin embargo, a partir de P25, los valores DI de los distintos grupos PCD, ya sean tratados o sin tratar, mostraron valores cercanos a cero o incluso negativos, por lo que tienen la memoria de reconocimiento afectada. Finalmente, el análisis del número de visitas totales a ambos objetos a P30 no mostró diferencias entre los grupos experimentales ($p > 0,05$), por lo que la ataxia cerebelosa no parece estar afectando al desarrollo de la prueba (Figura 34 D).

Por lo tanto, podemos concluir que las inyecciones diarias de NaCl de P10 a P20 no afectan al comportamiento explorador de los ratones PCD, pero el tratamiento diario con rhVEGF-B tampoco mejora la memoria de reconocimiento en los animales mutantes.

A continuación, evaluamos el comportamiento social mediante la prueba de preferencia social (Figura 34 E-H). Los ratones WT muestran una preferencia social clara en todas las edades analizadas (Figura 34 E-G; $p_{P17} = 0,029$; $p_{P25} = 0,011$; $p_{P30} = 0,002$). Sin embargo, no encontramos diferencias entre los distintos grupos de ratones PCD en ninguna de las edades analizadas (Figura 34 E-G; $p > 0,05$). Además, analizamos el SI, en el que observamos que únicamente los ratones WT mostraban valores positivos, mientras que el resto de los grupos experimentales mostraron valores cercanos a 0 o negativos, por

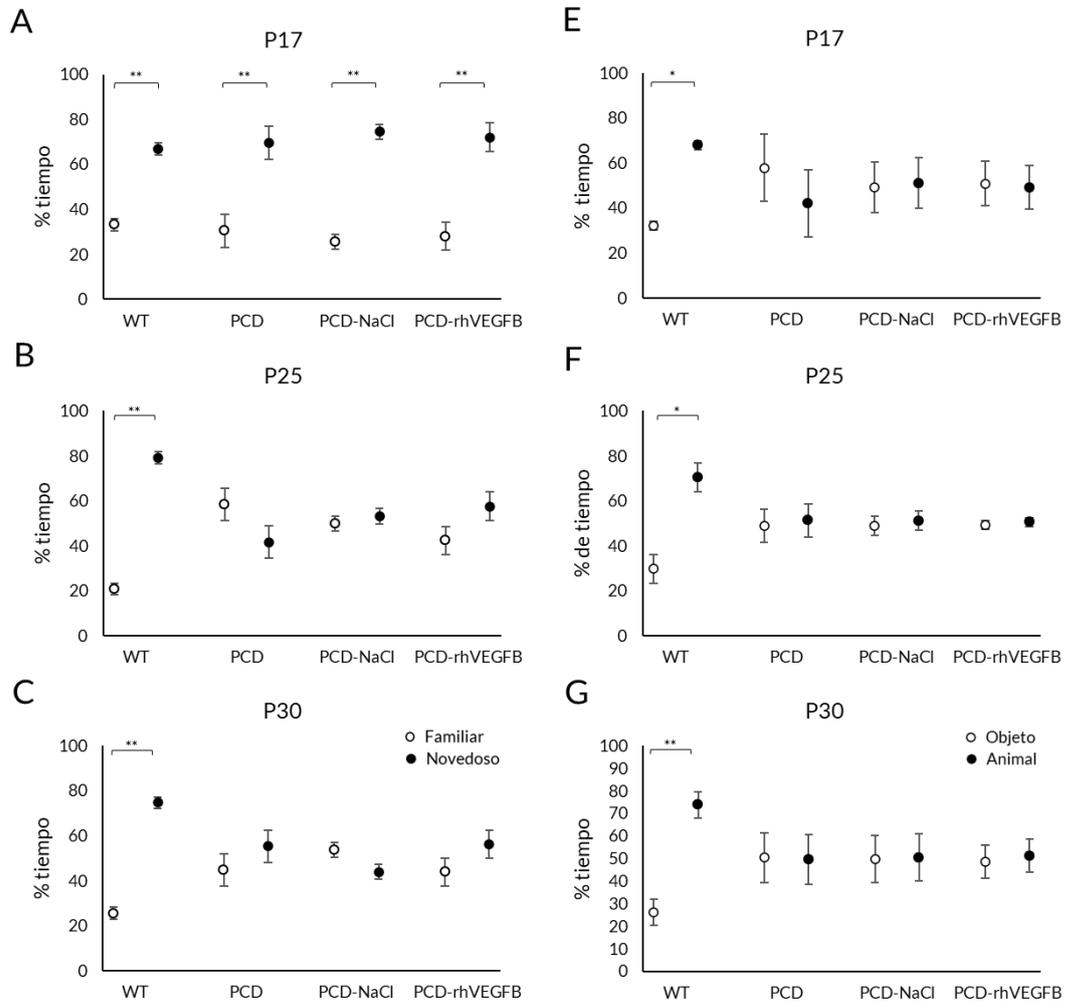
lo que encontramos alteraciones sociales desde el comienzo de la neurodegeneración (Figura 34 H). Por otro lado, el análisis del número de visitas totales al ratón y objeto a P30 tampoco mostró diferencias ($p > 0,05$), por lo que, una vez más, el efecto de la ataxia cerebelosa no influye en la realización de la prueba (Figura 34 H). Por lo tanto, el tratamiento diario con rhVEGF-B tampoco mejora el comportamiento social.

Finalmente, se analizó el efecto del tratamiento continuo en la función motora de los animales a P17, P25 y P30 (Figura 34 I). Una vez más, La prueba ANOVA de una vía con medidas repetidas mostró una interacción entre los factores “edad de la prueba” y “grupo experimental” ($p < 0,001$), debido a la gran disparidad de los datos, donde los ratones WT mejoran su comportamiento motor con la edad ($p < 0,001$), mientras que en los grupos experimentales PCD empeora, encontrando valores cercanos a 0 a P30 ($p < 0,001$ para todos los grupos PCD). A continuación, realizamos el análisis estadístico para comparar los grupos experimentales entre sí dentro de cada edad.

De manera similar a lo observado en el resto de las pruebas de comportamiento, existe una diferencia global entre el grupo de animales WT y los animales PCD, independientemente del tratamiento ($p < 0,001$ en todas las edades y grupos experimentales PCD frente a WT). Por otro lado, no encontramos diferencias entre los grupos experimentales PCD ($p > 0,05$).

En resumen, con estos datos podemos afirmar que el tratamiento diario con rhVEGF-B no mejora la capacidad motora, cognitiva y social del ratón PCD.

Figura 34. Efecto del tratamiento diario con rhVEGF-B en el comportamiento a lo largo del proceso neurodegenerativo del ratón PCD. (A-D) Análisis de la memoria de reconocimiento: (A-C) Cuantificación del porcentaje de tiempo explorando el objeto familiar y novedoso a P17 (A), P25 (B) y P30 (C) de ratones WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB (D) Tabla resumen del índice de discriminación a P17, P25 y P30 y el número de visitas totales a P30 en todos los grupos experimentales mencionados. El color azul indica valores positivos, mientras que el rojo negativos o próximos a 0. **(E-H) Análisis del comportamiento social:** (E-G) Cuantificación del porcentaje de tiempo explorando el animal u objeto a P17 (E), P25 (F) y P30 (G) de ratones WT, PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB (H) Tabla resumen del índice de sociabilidad a P17, P25 y P30 y número de visitas totales al animal y al objeto a P30 en los distintos grupos animales usados. El color azul indica valores positivos, mientras que el rojo negativos o próximos a 0. **(I) Análisis del comportamiento motor** a P17, P25 y P30 de los grupos experimentales mencionados anteriormente. Nótese que el tratamiento diario con rhVEGF-B no mejora ninguna de las capacidades analizadas, ya sea memoria de reconocimiento, sociabilidad o coordinación motora. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

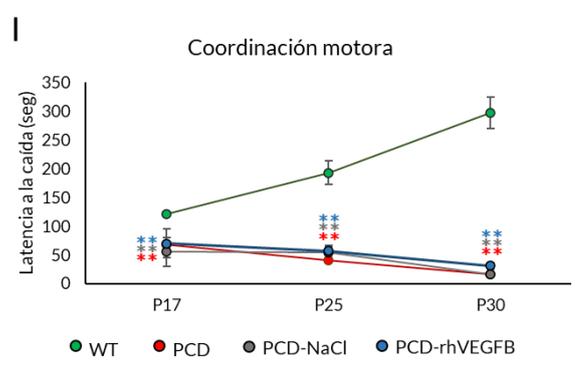


D

	Índice de Discriminación			Nº Visitas
	P17	P25	P30	P30
WT	0,337	0,453	0,487	24,4
PCD	0,391	-0,061	-0,056	24,3
PCD-NaCl	0,489	-0,045	-0,071	24,6
PCD-VEGFB	0,382	0,055	-0,035	25,2

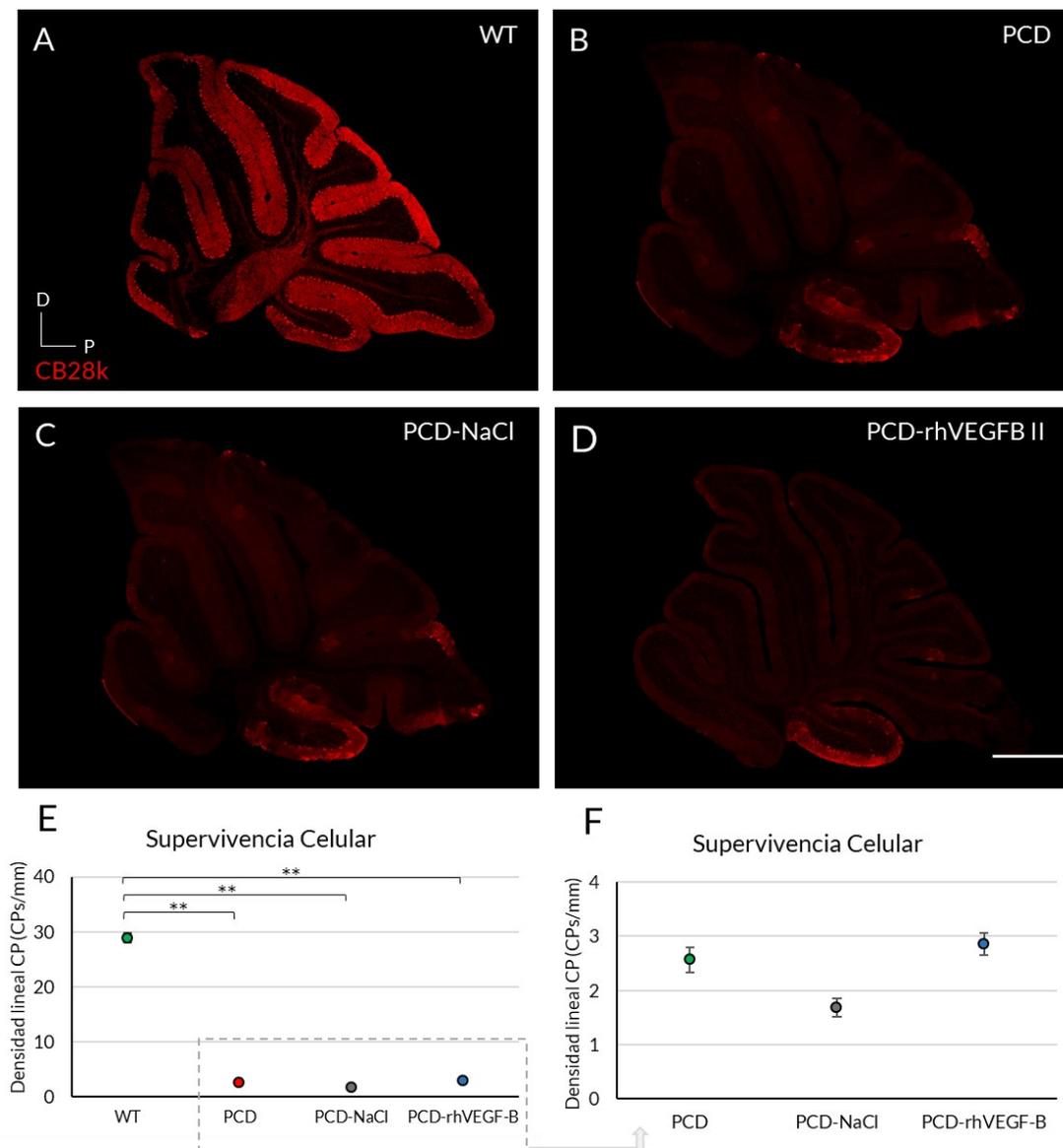
H

	Índice de Sociabilidad			Nº Visitas
	P17	P25	P30	P30
WT	0,358	0,599	0,381	28,8
PCD	-0,178	-0,021	-0,013	29,7
PCD-NaCl	-0,026	0,042	-0,006	27,7
PCD-VEGFB	0,018	-0,035	-0,025	28,4



Efecto del tratamiento a nivel histológico

Una vez más, con el fin de evaluar el efecto del tratamiento diario de rhVEGF-B sobre la supervivencia celular, analizamos la densidad lineal de las células de Purkinje a P30. Cualitativamente, se observó una reducción notable en la densidad celular en los ratones PCD -independientemente del tratamiento- (Figura 35 A-D). La cuantificación subsiguiente se llevó a cabo atendiendo a la densidad lineal de las células de Purkinje en el vermis completo, es decir, incluyendo los diez lóbulos. Observamos una reducción significativa en todos los grupos experimentales PCD (p PCD = 0,003; p PCD-NaCl < 0,001; p PCD-rhVEGFB = 0,002 p valor respecto a WT) comparados con los animales WT (Figura 35 E). Sin embargo, no observamos diferencias entre los ratones PCD, PCD-NaCl y PCD-rhVEGFB (Figura 35 F; $p > 0,05$).



Por lo tanto, el tratamiento diario con rhVEGF-B no produce un efecto neuroprotector en los ratones PCD. Estos datos sumados a los de comportamiento anteriores nos hicieron descartar el aumento en la frecuencia de administración de rhVEGF-B como tratamiento de elección. Es más, dado el éxito del tratamiento de esta sustancia administrada cada dos días, todo apunta a un efecto deletéreo de la misma a dosis excesivas.

Por todo ello, decidimos continuar la investigación sobre el origen de la recuperación funcional e histológica propiciada por el tratamiento más eficaz de los analizados: rhVEGF-B inyectado cada dos días.

ANÁLISIS AVANZADO DEL EFECTO NEUROPROTECTOR DE rhVEGF-B

Una vez comprobados los efectos neuroprotectores del tratamiento con rhVEGF-B administrado cada dos días sobre la densidad celular y las funciones cerebelosas asociadas con el comportamiento motor, cognitivo y social, decidimos realizar un análisis avanzado de esta neuroprotección, para determinar su posible origen. En primer lugar, las mejoras observadas en el comportamiento motor nos llevaron a estudiar el músculo esquelético, dado que resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que es un factor a tener en cuenta (Díaz *et al.*, 2018). Posteriormente, analizamos la calidad mitocondrial en las células de Purkinje, por ser una de las estructuras subcelulares afectadas por la mutación y que más pueden comprometer el funcionamiento neuronal (Cheng *et al.*, 2010; Bader y Winklhofer, 2020). Ambos análisis los realizamos en ratones WT, PCD y PCD-rhVEGFB; no usamos el grupo PCD-NaCl con el fin de reducir animales de experimentación, ya que comprobamos que el sistema de administración *per se* no produce cambios a nivel celular ni del comportamiento en ninguna de las pautas seguidas.

◀ **Figura 35. Efecto del tratamiento continuo con rhVEGF-B a nivel histológico a P30.** (A-D) Inmunofluorescencia para calbindina (Cb28k, rojo) en secciones sagitales de vermis cerebeloso de ratones WT (A), PCD (B), PCD-NaCl (C) y PCD-rhVEGFB (D). (E, F) Cuantificación del efecto del tratamiento continuo en la supervivencia de las células de Purkinje en el vermis completo de los cuatro grupos experimentales analizados (E), y excluyendo el dato de ratones WT (F). Como se puede apreciar, el tratamiento continuo con rhVEGF-B no mejora la supervivencia celular. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Barra de escala 500 μm .

Análisis del músculo esquelético

Aunque el aumento de la densidad de células de Purkinje se relaciona con una mejora en el comportamiento motor, estudios previos han mostrado que también puede deberse a una mejora en el músculo esquelético (Díaz *et al.*, 2018). Además, otros autores han demostrado que el tratamiento con factores neurotróficos produce mejoras en la estructura muscular de ratones PCD, lo que se asocia con un incremento en la coordinación motora (Carrascosa *et al.*, 2004). Finalmente, uno de los lugares de expresión mayoritaria del VEGFR1 es el músculo esquelético (Olofsson *et al.*, 1996; Aase *et al.*, 1999; Capoccia *et al.*, 2009; Bry *et al.*, 2014). Por todo ello, decidimos analizar este tejido adicionalmente al cerebelo. Este análisis se basó en tinciones histológicas con hematoxilina-eosina del músculo esquelético –cortado longitudinal y transversalmente– de animales WT, PCD y PCD-rhVEGFB a P30. En el corte longitudinal (Figura 36 A), analizamos la longitud y anchura medias de cada fibra muscular, obteniendo su longitud mayor (Figura 36 C) y menor (Figura 36 D), respectivamente. Mediante el análisis del músculo en posición transversal (Figura 36 B), analizamos el área transversal media de cada fibra (Figura 36 E; ver *Material y Métodos*).

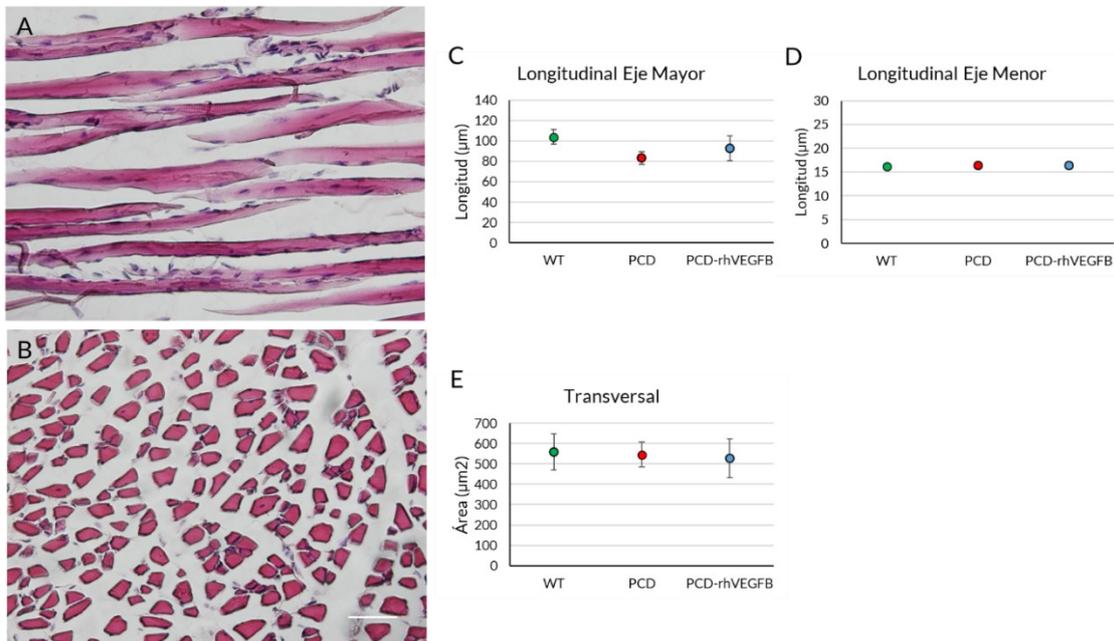


Figura 36. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B sobre el músculo esquelético a P30. (A, B) Microfotografías del músculo esquelético de un ratón WT cortado longitudinalmente (A) y transversalmente (B). (C, D) Estimación de la longitud del eje mayor (C) y menor (D) del músculo esquelético en sección longitudinal. (E) Cuantificación del área de las fibras musculares cortadas transversalmente. Obsérvese que no hay diferencias entre los grupos experimentales en ninguna disposición de corte. Barra de escala 50 μm.

El test estadístico de Kruskal-Wallis no mostró diferencias entre los grupos experimentales ni en sección longitudinal, ya sea considerando la longitud mayor o menor, ni en posición transversal (Figura 36 C-E; $p > 0,05$). Por lo tanto, la mejora en la realización de las pruebas motoras no parece deberse a un efecto del rhVEGF-B en el músculo esquelético. De esta manera, el origen de esta mejora se puede considerar –al menos en gran medida– de tipo cerebeloso.

Implicación de la mitocondria

Como se ha comentado en la *Introducción* de esta Tesis Doctoral, los ratones PCD sufren una disfunción mitocondrial, donde se observa que las mitocondrias de las células de Purkinje son más pequeñas, más redondas y menos numerosas que aquellas procedentes de ratones WT (Gilmore-Hall *et al.*, 2019). Sin embargo, estos estudios se realizaron principalmente en cultivos de células de Purkinje alrededor de P25, donde la neurodegeneración cerebelosa es patente. Por ello, en la presente Tesis Doctoral hemos abordado el estudio de la mitocondria en los ratones mutantes de una forma más longitudinal con dos objetivos.

En primer lugar, quisimos conocer cuándo comienza la disfunción mitocondrial y cómo avanza con la neurodegeneración cerebelosa; para ello, analizamos varios marcadores mitocondriales relacionados con el correcto funcionamiento de estos orgánulos en las células de Purkinje de ratones WT y PCD a P10 –antes del comienzo de cualquier signo degenerativo–, P15 –el comienzo de la preneurodegeneración– y P25 –momento en el que las células de Purkinje están muriendo–.

En segundo lugar, analizamos si el tratamiento con rhVEGF-B administrado cada dos días modifica estos marcadores mitocondriales (alterados en los ratones mutantes), para lo que usamos un nuevo grupo de animales tratados con rhVEGF-B y llevamos a cabo el análisis a P25, edad a la que los efectos del tratamiento fueron más llamativos, lográndose una protección y supervivencia máxima de las células de Purkinje.

Para ambos objetivos hemos utilizado marcadores de la capacidad de la fosforilación oxidativa, así como aquellos implicados en la respuesta al estrés y que se activan tras la disfunción mitocondrial. En primer lugar, analizamos la expresión de la subunidad 1 de la enzima citocromo c oxidasa (MTCO1²⁸), un componente de la cadena transportadora de electrones. Por otro lado, para el análisis de la respuesta al estrés, estudiamos la expresión

²⁸ Del inglés *Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I*

de la enzima piruvato carboxilasa (PCx²⁹), que se encuentra presente en la mitocondria e interviene en el mantenimiento de una concentración adecuada de varios componentes del ciclo de Krebs, y de la serina hidroximetiltransferasa 2 (SHMT2³⁰), una enzima imprescindible en el ciclo del folato que ocurre en la mitocondria.

Cambios mitocondriales asociados a la mutación *pcd*

Para evaluar posibles cambios en los marcadores mitocondriales elegidos, utilizamos la medida de la densidad integrada, que analiza la intensidad de cada marcaje y su área ocupada, relativizándolo al área del soma neuronal (Ver *Material y Métodos*). Estos análisis se llevaron a cabo en ratones WT y PCD a P10, P15 y P25, es decir, antes y durante el proceso neurodegenerativo de los ratones mutantes. Para realizar este estudio, analizamos de forma general todas las medidas de intensidad posibles según el umbral de exposición o *threshold* de cada imagen (entre 0, o nula exposición, y 255 o saturación total).

A continuación, para un análisis más preciso, elegimos un *threshold* representativo para cada marcador, de manera que definiese una intensidad del marcaje resultante nítida, pero sin llegar a la saturación. Este *threshold* fue el mismo a lo largo de las edades analizadas: para MTCO1 y PCx elegimos el *threshold* número 40, y para SHMT2, el 25.

A P10 observamos cambios en todos los marcadores utilizados (Figura 37). El análisis general de MTCO1 mostró una disminución de expresión en los ratones PCD con respecto a los WT (Figura 37 A). La prueba no paramétrica U de Mann-Whitney del *threshold* individual 40 reveló diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 37 B; $p = 0,029$). Por otro lado, el análisis general de PCx mostró un aumento de expresión en ratones PCD con respecto a los animales WT (Figura 37 E). Cuando realizamos el análisis individual, también encontramos diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Figura 37 F; $p = 0,029$). Finalmente, de manera similar, encontramos un aumento en la expresión de SHMT2 en ratones PCD frente a los WT (Figura 37 I). De nuevo, este aumento se vio reflejado en el análisis individual, donde encontramos diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 37 J; $p = 0,029$).

El estudio a P15 también mostró diferencias entre los grupos experimentales (Figura 38). En el análisis general de los *Threshold* observamos diferencias entre los grupos experimentales en todos los marcadores analizados (Figura 38 A, E, I). El análisis individual

²⁹ Del inglés *Pyruvate Carboxylase*

³⁰ Del inglés *Serine Hydroxymethyltransferase 2*

mostró una disminución significativa de la expresión de MTCO1 en ratones PCD frente a WT (Figura 38 B; $p = 0,029$). Por su parte, PCx aumentó su expresión en ratones PCD en comparación con los ratones WT (Figura 38 F; $p = 0,029$), así como SHMT2, donde también encontramos diferencias significativas (Figura 38 J; $p = 0,029$).

Finalmente, a P25 también observamos diferencias entre los grupos experimentales (Figura 39). De forma similar, el análisis de MTCO1 mostró una expresión reducida en los ratones PCD frente a WT (Figura 39 A), mostrando diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 39 B; $p = 0,029$). Sin embargo, no encontramos cambios en la expresión de PCx entre ratones WT y PCD, ni de forma general (Figura 39 E; $p > 0,05$), ni en el análisis individual (Figura 39 F; $p > 0,05$). Finalmente, el análisis de SHMT2 mostró un aumento de la expresión en ratones PCD frente a WT (Figura 39 J; $p = 0,029$), que fue similar a lo observado en el resto de las edades analizadas.

Estos datos ponen de manifiesto por primera vez que existe una disfunción mitocondrial antes incluso del comienzo de la preneurodegeneración. Esta disfunción provoca un aumento de la respuesta al estrés mitocondrial, mediada por PCx y SHMT2. Sin embargo, a P25, los mecanismos protectores mediados por PCx decaen, debido probablemente a la notable muerte celular que está ocurriendo en los ratones mutantes.

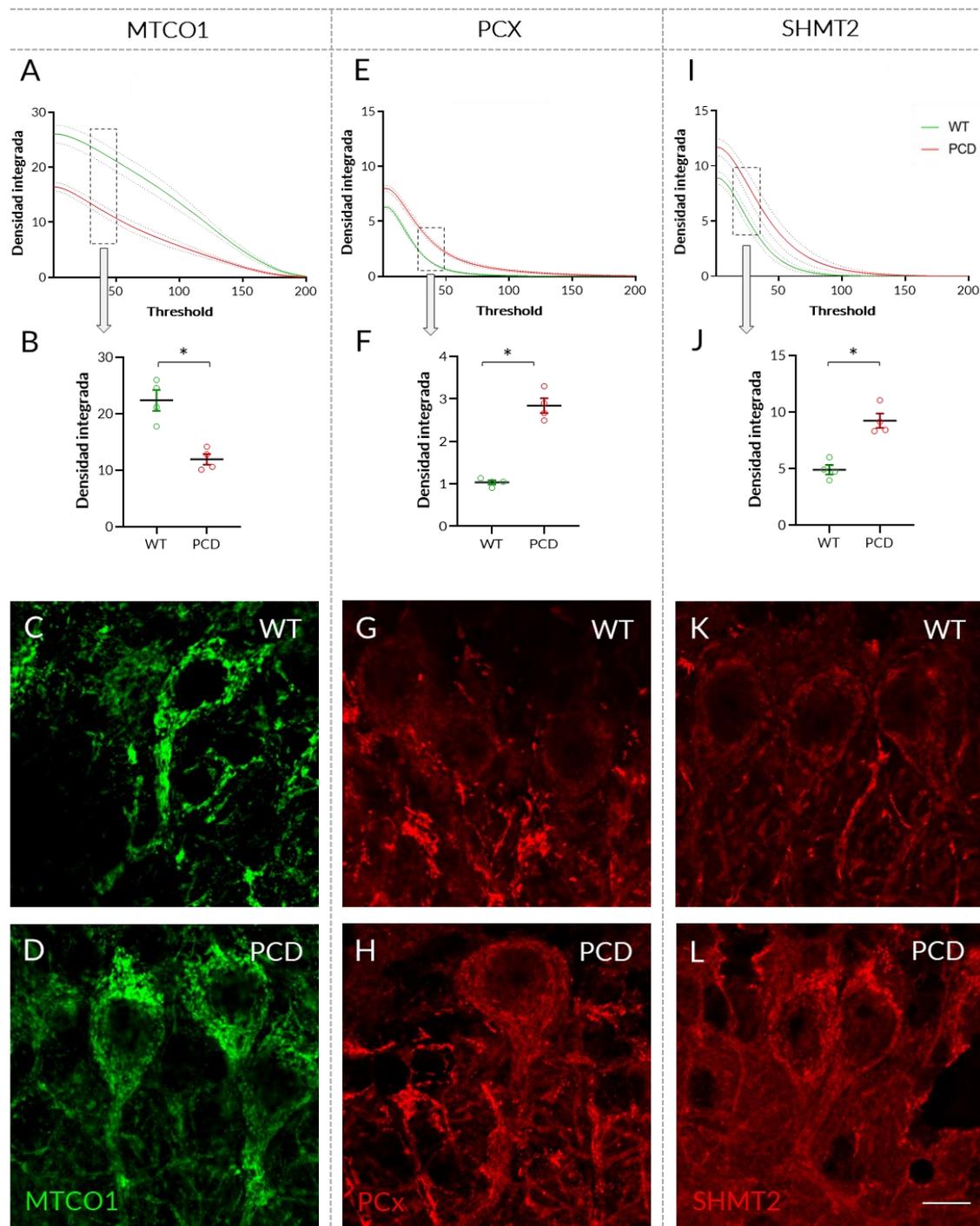


Figura 37. Efecto de la mutación *pcd* sobre la calidad mitocondrial a P10. (A-D) Análisis de MTCO1: (A, B) Cuantificación de la densidad integrada para los distintos valores *threshold* (A) y para el valor específico 40 (B). (C, D) Microfotografías de células de Purkinje marcadas con MTCO1 (verde) de ratones WT (C) y PCD (D). **(E-H) Análisis de PCx:** (E, F) Cuantificación de la densidad integrada general (E) y del valor individual 40 (F). (G, H) Inmunofluorescencia de PCx (rojo) en células de Purkinje de ratones WT (G) y PCD (H). **(I-L) Análisis de SHMT2:** (I, J) Cuantificación de la densidad integrada general (I) y del valor del *threshold* 25 (J). (K, L) Microfotografías de células de Purkinje marcadas con SHMT2 (rojo) de ratones WT (K) y PCD (L). Como se puede apreciar, existe una disfunción mitocondrial desde P10, donde se observa una reducción de los niveles de MTCO1 y un aumento en PCx y SHMT2. Barra de escala 10 μm . * $p < 0,05$.

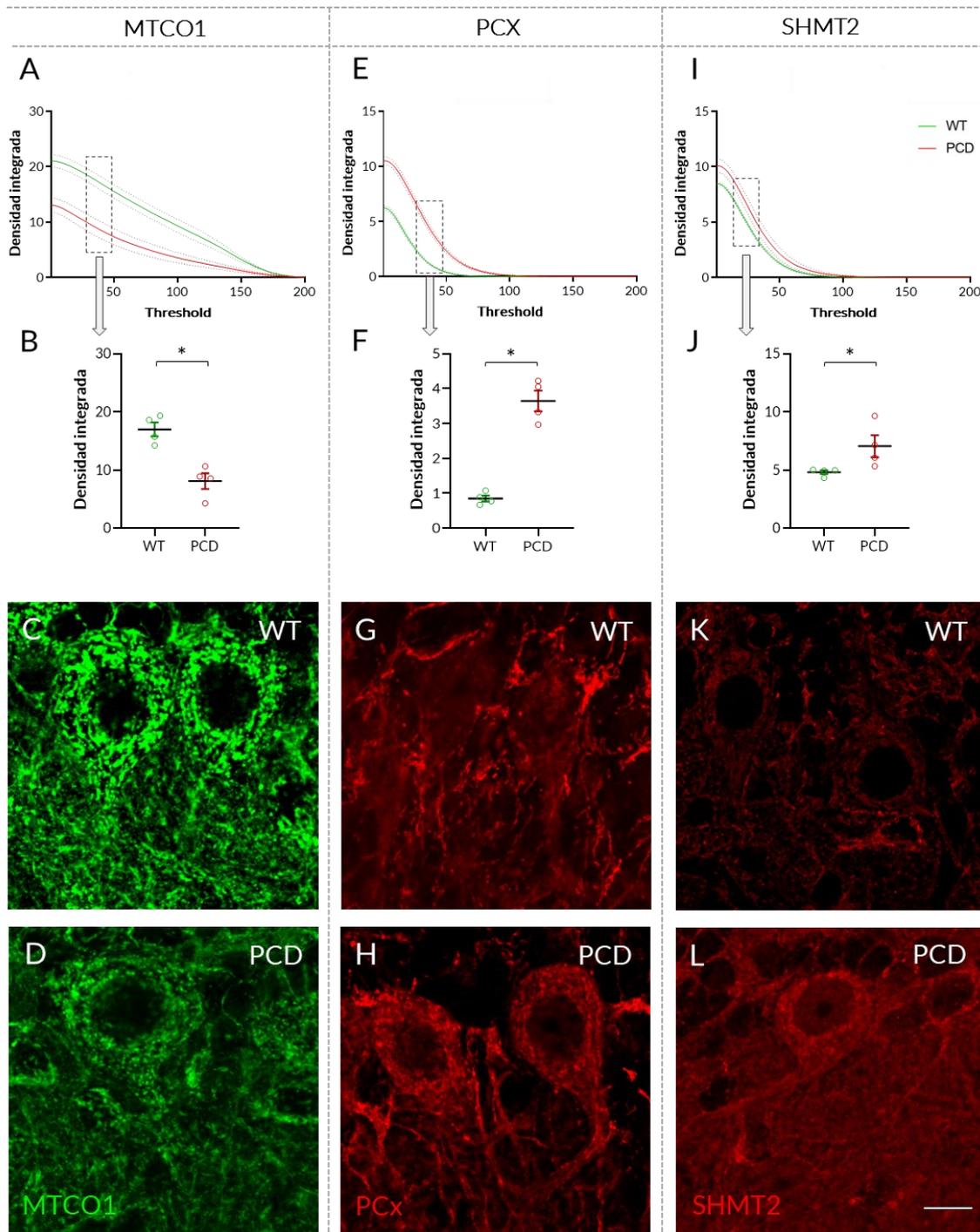


Figura 38. Efecto de la mutación *pcd* sobre en la calidad mitocondrial a P15. (A-D) Análisis de MTCO1: (A, B) Cuantificación de la densidad integrada para los distintos valores *threshold* (A) y para el valor específico 40 (B). (C, D) Microfotografías de células de Purkinje marcadas con MTCO1 (verde) de ratones WT (C) y PCD (D). (E-H) Análisis de PCx: (E, F) Representación gráfica de la densidad integrada general (E) y del valor individual 40 (F). (G, H) Inmunofluorescencia de PCx (rojo) en células de Purkinje de ratones WT (G) y PCD (H). (I-L) Análisis de SHMT2: (I, J) Cuantificación de la densidad integrada general (I) y del valor del *threshold* 25 (J). (K, L) Microfotografías de células de Purkinje marcadas con SHMT2 (rojo) de ratones WT (K) y PCD (L). Nótese la marcada reducción de MTCO1, y el aumento de PCx y SHMT2 en los ratones PCD. Barra de escala 10 μm. * $p < 0,05$.

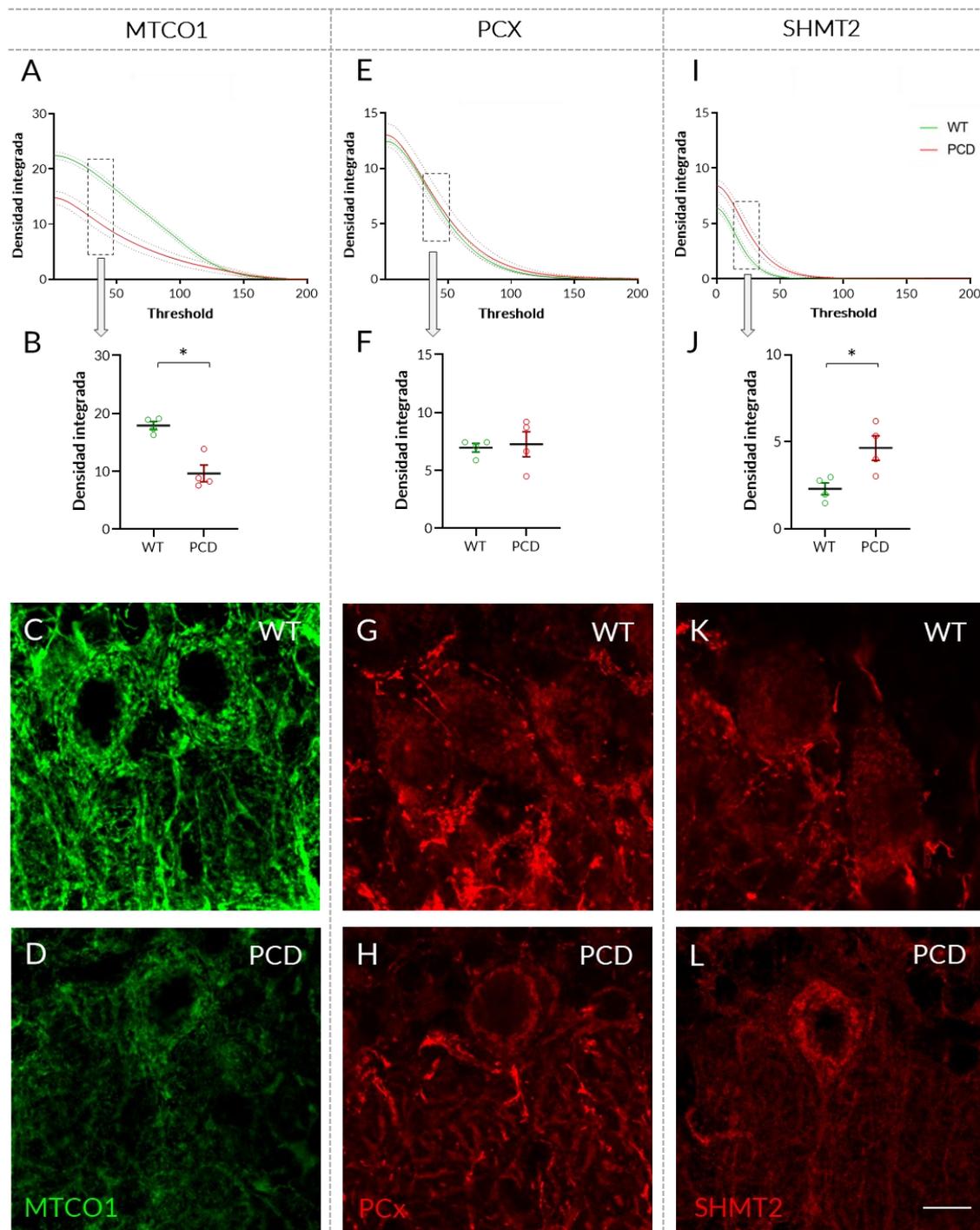


Figura 39. Efecto de la mutación *pcd* sobre en la calidad mitocondrial a P25. (A-D) Análisis de MTCO1: (A, B) Representación gráfica de la densidad integrada para los distintos valores *threshold* (A) y para el valor específico 40 (B). (C, D) Microfotografías de células de Purkinje marcadas con MTCO1 (verde) de ratones WT (C) y PCD (D). **(E-H) Análisis de PCx:** (E, F) Análisis de la densidad integrada general (E) y del valor individual 40 (F). (G, H) Inmunofluorescencia de PCx (rojo) en células de Purkinje de ratones WT (G) y PCD (H). **(I-L) Análisis de SHMT2:** (I, J) Cuantificación de la densidad integrada general (I) y del valor del *threshold* 25 (J). (K, L) Microfotografías de células de Purkinje marcadas con SHMT2 (rojo) de ratones WT (K) y PCD (L). Como se puede observar, existe una notable reducción de MTCO1. Sin embargo, la respuesta al estrés mediada por PCx termina a esta edad, aunque se sigue observando un aumento en SHMT2. Barra de escala 10 μm . * $p < 0,05$.

Efecto del tratamiento con rhVEGF-B en la calidad mitocondrial

Una vez comprobada la influencia de la mutación *pcd* sobre la calidad mitocondrial, decidimos analizar si el tratamiento con rhVEGF-B normaliza los parámetros alterados en los ratones mutantes. Por tanto, analizamos la expresión de los marcadores mencionados anteriormente en ratones WT, PCD y PCD-rhVEGFB a P25 (Figura 40).

Comenzando con MTCO1, de manera general observamos en los animales PCD-rhVEGFB unos valores similares a los ratones WT (Figura 40 A). La prueba no paramétrica Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas entre los ratones PCD con respecto a WT ($p = 0,008$) y PCD-rhVEGFB (Figura 40 B; $p < 0,001$). Por su parte, los ratones WT y PCD-rhVEGFB no mostraron diferencias significativas entre ellos ($p > 0,05$). Sin embargo, observamos un aumento de PCx en los ratones tratados con rhVEGF-B (Figura 40 D), encontrando diferencias significativas con los grupos experimentales WT ($p = 0,023$) y PCD (Figura 40 E; $p = 0,032$). Finalmente, el análisis de SHMT2, mostró un aumento de expresión en los animales PCD -independientemente del tratamiento- con respecto a los ratones WT, encontrando diferencias significativas (Figura 40 G, H; $p_{PCD} = 0,024$; $p_{PCD-rhVEGFB} = 0,014$, p valor respecto a WT). Además, no se observan diferencias entre los animales PCD y PCD tratados con rhVEGF-B ($p > 0,05$).

Por tanto, el tratamiento con rhVEGF-B parece normalizar los niveles de MTCO1 que se encuentran reducidos en animales mutantes. Sin embargo, no parece normalizar la respuesta al estrés mitocondrial, ya que, en ambos casos, se encuentra al alza; es más, en el caso de PCx se mantiene extendida hasta P25. Todo ello sugiere una recuperación parcial de la calidad mitocondrial.

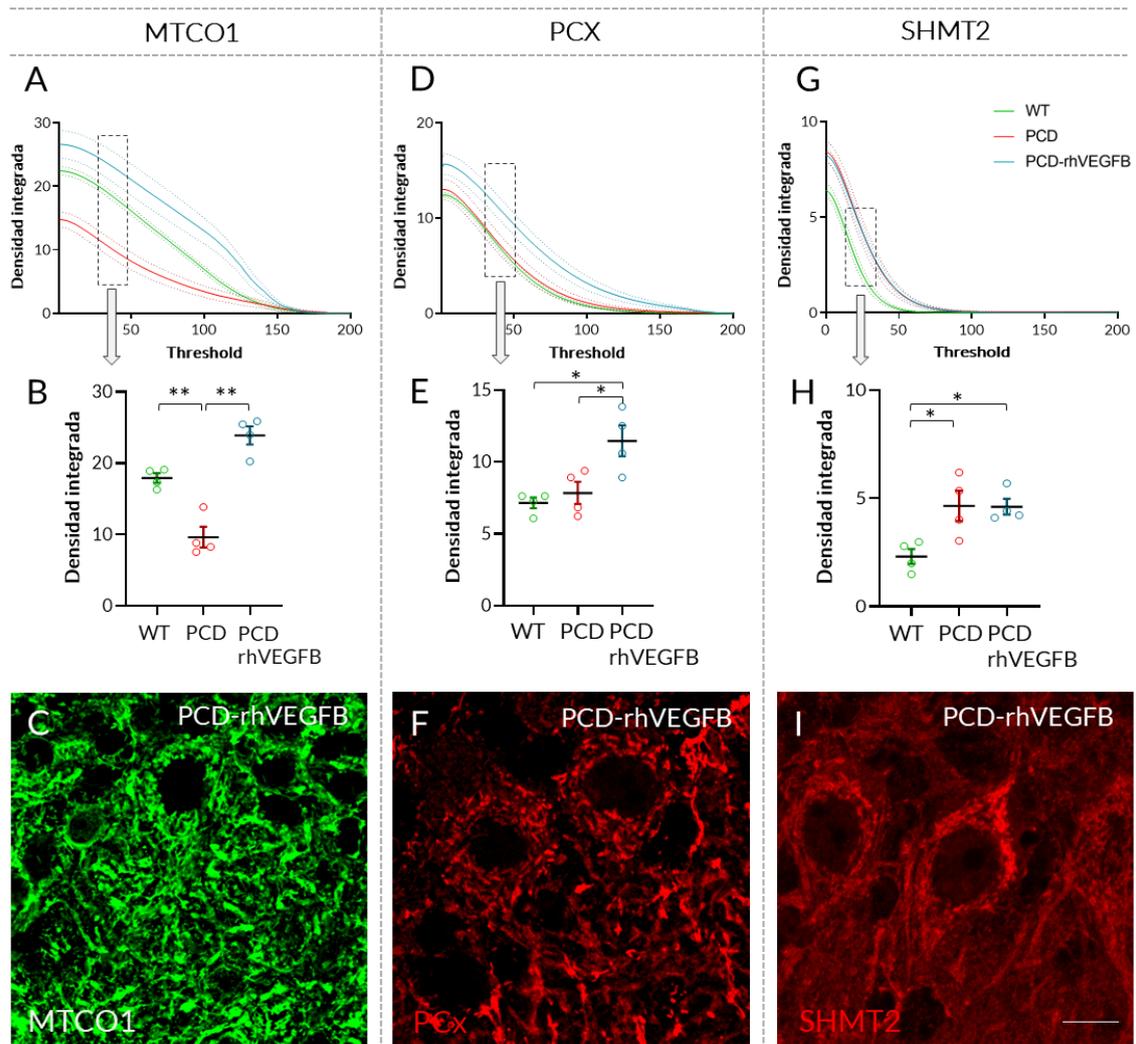
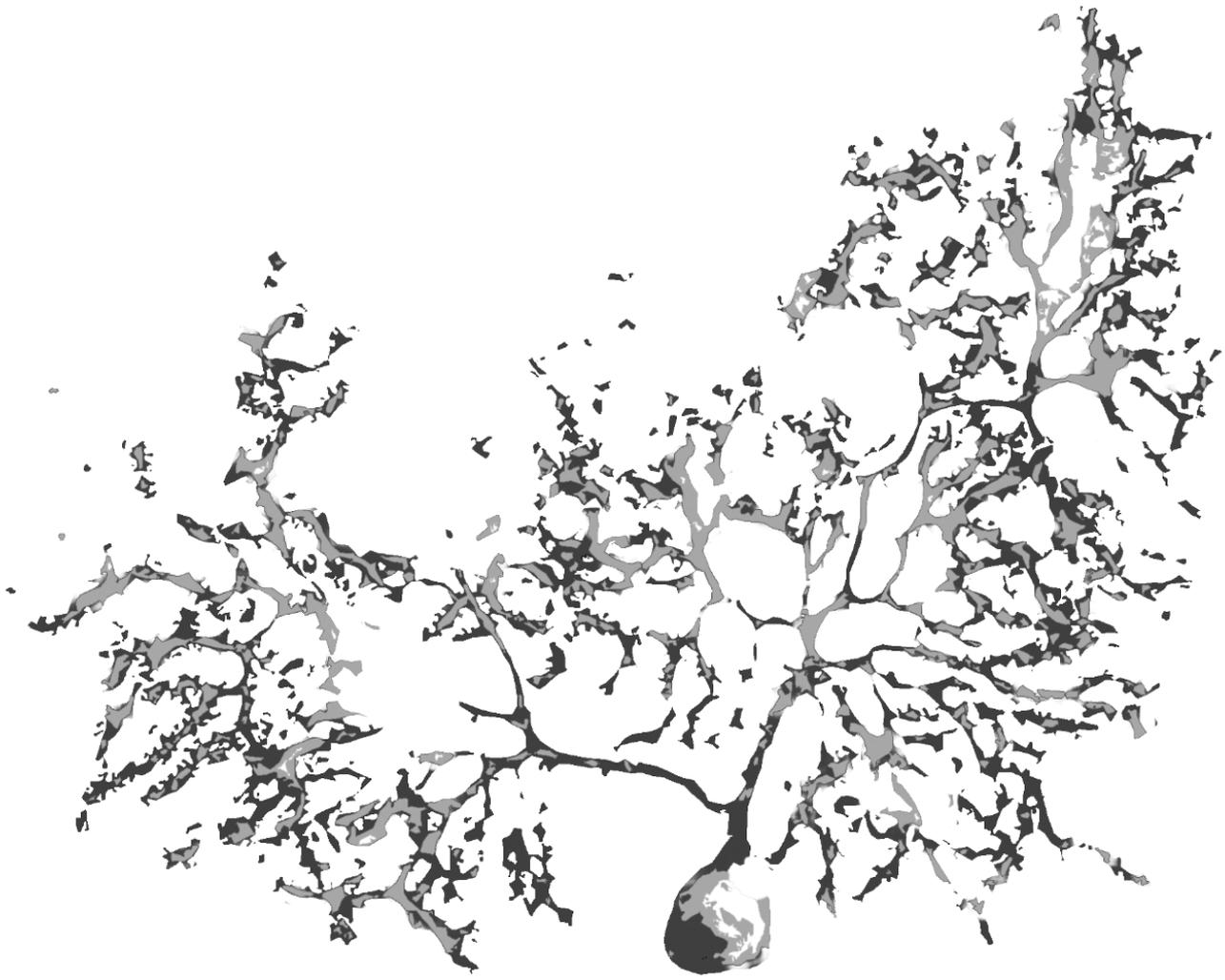


Figura 40. Efecto del tratamiento con rhVEGF-B en la calidad mitocondrial a P25. (A-C) Análisis de MTCO1: (A, B) Representación gráfica de la densidad integrada general (A) y del *Threshold* 40 (B) en ratones WT, PCD y PCD tratados con rhVEGF-B. (C) Inmunofluorescencia para MTCO1 (verde) en células de Purkinje de ratones PCD-rhVEGFB. **(D-F) Análisis de PCx:** (D, E) Representación gráfica de la densidad integrada general (D) y del *Threshold* 40 (E). (F) Inmunofluorescencia para PCx (rojo) de células de Purkinje de ratones PCD-rhVEGFB. **(G-I) Análisis de SHMT2:** Representación gráfica de la densidad integrada general (D) y del *Threshold* 25 (E). (F) Inmunofluorescencia para SHMT2 (rojo) de células de Purkinje de ratones PCD-rhVEGFB. Nótese el aumento de MTCO1 en los ratones tratados con rhVEGF-B. Sin embargo, el tratamiento no parece recuperar los niveles de PCx y SHMT2 a valores normales. Barra de escala 10 μ m. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.



DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha llevado a cabo la búsqueda de sustancias con posible uso terapéutico contra la neurodegeneración mediante el *screening* de varios factores neurotróficos que intervienen en el crecimiento, el desarrollo y la protección neuronal. En concreto, se ha analizado la expresión de *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* y *Vegf-B* a lo largo del proceso degenerativo que afecta al cerebelo del ratón PCD. Además, se ha evaluado la capacidad neuroprotectora de las proteínas recombinantes humanas de los factores neurotróficos que se encontraron alterados en dicho modelo: IGF-1 y VEGF-B. Así, hemos comprobado, por un lado, que no existe una mejora tras el tratamiento farmacológico con rhIGF-1 y, por otro, la eficacia del tratamiento con rhVEGF-B. En este sentido, la administración de este último compuesto mostró de forma global una neuroprotección en los ratones mutantes, tanto a nivel histológico como del comportamiento. Finalmente, observamos que VEGF-B desempeña un papel fundamental en la calidad mitocondrial, permitiendo una recuperación parcial del estado de estos orgánulos citoplasmáticos. A continuación, se discutirán todos estos resultados comparándolos con la bibliografía existente y siempre desde un punto de vista traslacional.

BÚSQUEDA DE NUEVAS MOLÉCULAS CON USO TERAPÉUTICO: CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE IGF-1 Y VEGF-B EN EL RATÓN MUTANTE PCD

Para la búsqueda de nuevas sustancias terapéuticas llevamos a cabo el análisis génico y proteico de varios factores neurotróficos en el cerebelo, región encefálica de interés en esta Tesis Doctoral. Adicionalmente, también realizamos el estudio de la producción de las proteínas correspondientes en el plasma sanguíneo. Como resultado, encontramos diferencias en dos de los factores analizados, IGF-1 y VEGF-B.

En el caso de IGF-1, observamos cambios a P25 y a P40 en los ratones PCD. A P25 vimos un aumento de expresión génica que se correspondía con el aumento de producción proteica en el cerebelo de ratones PCD. Sin embargo, a esta misma edad observamos una disminución de la proteína en plasma. En primer lugar, es necesario tener en cuenta que el IGF-1 se produce en todos los tipos celulares del SNC (Bach *et al.*, 1991; Bondy y Lee, 1993). A pesar de ello, la expresión de mRNA del IGF-1 en el encéfalo es relativamente baja, por lo que es de vital importancia su producción a nivel periférico (Fernández y Torres-Alemán, 2012), siendo esta más del 70% de la producción total (Botusan *et al.*, 2018).

En este sentido, a P25 parece que el cerebelo demanda grandes cantidades de IGF-1 por lo que encontramos un aumento de expresión génica y proteica en esta estructura, acompañado de una reducción en sangre. Debemos recordar que a P25 en los ratones PCD se está produciendo una muerte de células de Purkinje muy rápida y agresiva (Mullen *et al.*, 1976; Baltanás, *et al.*, 2011a), y que el IGF-1 tiene efectos neuroprotectores que favorecen la regeneración axonal o la remielinización, entre otros (McMorris *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1995). Así, una posible hipótesis sería que la producción periférica de IGF-1 está viajando al encéfalo para cubrir esas necesidades, ya que los niveles de producción de IGF-1 intrínsecos del encéfalo resultan bajos ante su gran demanda (Fernández y Torres-Alemán, 2012).

Por su parte, a P40 encontramos un aumento de expresión génica, que no se corresponde con la expresión proteica en el tejido cerebeloso (siendo esta similar a la de los ratones WT), pero sí encontramos un aumento en el plasma sanguíneo. Por tanto, estamos ante una situación opuesta: a pesar del aumento de expresión génica en el cerebelo, la cantidad proteica de IGF-1 se mantiene similar en esta zona, mientras que aumenta en el plasma. A P40 la degeneración de las células de Purkinje ya se puede considerar concluida; sin embargo, el efecto de la mutación *pcd* provoca a esta edad la degeneración de otras poblaciones celulares (Mullen *et al.*, 1976; Blanks *et al.*, 1982; Fernández-González *et al.*, 2002). De esta manera, debido a los efectos sistémicos que presenta este factor neurotrófico (Laron, 2001; Yakar y Adamo, 2012), esta demanda génica de IGF-1 parece deberse a otras situaciones fisiopatológicas que están ocurriendo fuera del cerebelo, e incluso fuera del encéfalo (Baltanás *et al.*, 2021).

Por su parte, para VEGF-B encontramos fluctuaciones a P15 y P20. A P15 aumenta la expresión génica en los ratones PCD, lo que se corresponde con un incremento en la producción proteica en el cerebelo. Sin embargo, a esta edad no vimos alteraciones en la expresión proteica en plasma sanguíneo. La producción de VEGF-B se da en la mayoría de las células neurales (Sun *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014), por lo que todo apunta a que su fluctuación sea principalmente local. Debemos recordar que el comienzo de la preneurodegeneración cerebelosa del ratón PCD se estima alrededor de P15, con alteraciones citoplasmáticas y nucleares en las células de Purkinje (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

El aumento de VEGF-B puede estar asociado al comienzo de esta fase de la degeneración cerebelosa, ya que se ha demostrado que tras el daño neuronal se produce un aumento de VEGF-B, con una función importante en el proceso de reparación celular (Nag *et al.*, 2002). No solo eso, VEGF-B está íntimamente relacionado con la calidad mitocondrial (Olsson *et al.*, 2006; X. Li *et al.*, 2008; Dhondt *et al.*, 2011), y varios estudios muestran que el PCD sufre la disfunción de estos orgánulos (Chakrabarti *et al.*, 2009; Gilmore-Hall *et al.*, 2019). Estos datos se han verificado *in vitro* o *in vivo* en animales mutantes en etapas avanzadas de la neurodegeneración, por lo que, hasta ahora, se desconocía el comienzo de la disfunción mitocondrial. Nuestros resultados demuestran que este podría estar relacionado con el aumento de VEGF-B en el cerebelo también a P15 (ver más adelante).

Por otro lado, a P20 encontramos una reducción de la expresión tanto a nivel génico en el cerebelo como proteico en plasma sanguíneo, sin que hubiese cambios en la producción proteica en el tejido cerebeloso. Alrededor de P20 comienza la muerte de las células de Purkinje (etapa degenerativa propiamente dicha). Sin embargo, en este momento observamos una reducción de la expresión cerebelosa de *Vegf-B* en los ratones mutantes. Otra de las funciones de VEGF-B es su efecto antiapoptótico, que promueve la supervivencia celular. Este efecto lo realiza mediante su interacción con el receptor VEGFR1, induciendo la expresión de genes antiapoptóticos, como *Bcl-2* e inhibiendo aquellos proapoptóticos como los de la subfamilia BH3 y proteínas relacionadas con la muerte celular, incluidas p53 y miembros de la familia de las caspasas (Y. Li *et al.*, 2008). Curiosamente, a P22 en los ratones PCD encontramos una disminución de proteínas antiapoptóticas, como *Bcl-2* (Gillardon *et al.*, 1995). En este sentido, VEGF-B podría estar generando un ambiente antiapoptótico y neuroprotector mientras su expresión se encuentra al alza, razón por la cual, tras la disminución de su expresión, encontramos un aumento de la muerte celular programada, debido a la alteración en los niveles de proteínas apoptóticas. En este sentido, el aumento de VEGF-B sería transitorio y marcado únicamente en las fases iniciales de la degeneración cerebelosa, como ocurre en otros modelos de Parkinson, donde existe una regulación al alza tras el daño neuronal (Falk *et al.*, 2009). Tal y como se discutirá más adelante, los resultados correspondientes al retraso de la apoptosis de las células de Purkinje tras el tratamiento con rhVEGF-B, así como el análisis de la calidad mitocondrial apoyan esta hipótesis.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, como se puede comprobar, cada factor neurotrófico que se encuentra alterado por la mutación *pcd* parece guardar relación con una etapa del proceso degenerativo cerebeloso. Inicialmente, encontramos cambios en VEGF-B correspondientes con las etapas tempranas de este proceso: P15 –cuando comienza la preneurodegeneración– y P20 –el comienzo de la muerte neuronal–. Posteriormente, IGF-1 aumenta su expresión en etapas más tardías: P25 –en plena muerte neuronal– y P40 –fin del proceso degenerativo del cerebelo–.

El patrón de expresión de estos dos factores neurotróficos nos fue muy útil para crear un diseño experimental (que se discutirá a continuación), según el cual tratamos a los ratones PCD con rhIGF-1 y rhVEGF-B. En ambos tratamientos, usamos un grupo *sham* de animales PCD tratados con NaCl para comprobar el efecto de las inyecciones continuas, ya que, como se apuntó con anterioridad, el uso repetido estas pueden producir un serio estrés debido a la inmovilización, los efectos irritantes acumulativos o el daño de la aguja (Morton *et al.*, 2001).

EL rhIGF-1 NO PRODUCE UN EFECTO NEUROPROTECTOR EN LOS RATONES PCD

Los resultados obtenidos tras el análisis génico y proteico de IGF-1 nos permitieron establecer un patrón de administración de rhIGF-1 a ratones PCD. Puesto que las alteraciones de IGF-1 en los animales mutantes comenzaron a P25, realizamos el tratamiento desde P20 a P30, es decir, cinco días antes del comienzo de los cambios, y extendiéndonos un tiempo después de estos, con una pauta de administración diaria. Esta estrategia de administración se adecuó a estudios previos que evaluaron las propiedades terapéuticas de rhIGF-1 en modelos animales de diversas enfermedades neurodegenerativas. En todos ellos, la pauta de administración fue continua y diaria durante largos periodos de tiempo (Castro *et al.*, 2014; Puche *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2018, entre otros). Durante todo el tratamiento se monitorizó el peso corporal de los ratones de todos los grupos experimentales. El efecto neuroprotector del rhIGF-1 administrado se comprobó mediante pruebas de comportamiento para medir la capacidad motora, cognitiva y social, así como con la cuantificación de las células de Purkinje supervivientes a P30.

El rhIGF-1 produce un aumento del peso corporal en los ratones PCD

Durante todo el tiempo que duró el tratamiento con rhIGF-1, se monitorizó el peso corporal de los ratones de todos los grupos experimentales. Gracias a esta medición observamos un menor peso corporal de los ratones mutantes en comparación con los WT, tal y como se había descrito previamente (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Además, encontramos una recuperación del peso en los ratones tratados con rhIGF-1, llegando a valores similares a los de los ratones WT. En primer lugar, hay que tener en cuenta que el IGF-1 es un potente factor de crecimiento que estimula el desarrollo del cuerpo de forma sistémica y tiene efectos promotores del crecimiento en casi todas las células del cuerpo, ya sea músculo esquelético, cartílago, hueso o células nerviosas (Laron, 2001; Yakar y Adamo, 2012). Por otro lado, son varios los estudios que encajan con nuestros resultados, al demostrar que tras el tratamiento con IGF-1 se obtiene un aumento del peso corporal en los animales de investigación (Carrascosa *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2014). Por tanto, el tratamiento con rhIGF-1 recupera la pérdida de peso corporal observada en los ratones PCD; como veremos, este fue el único efecto beneficioso encontrado en nuestro estudio.

El tratamiento con rhIGF-1 no influye en el comportamiento de los ratones PCD ni ralentiza su pérdida neuronal

Tradicionalmente se ha considerado al cerebelo como una estructura de integración sensoriomotora (Ito, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007; Manto *et al.*, 2012). Sin embargo, en las últimas décadas se ha demostrado que el cerebelo participa en otras funciones de tipo cognitivo, afectivo y social, además de aquellas relacionadas con el lenguaje, la atención y la memoria (Reeber *et al.*, 2013; Vožeh, 2015; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Carta *et al.*, 2019). En este sentido, tal y como se ha descrito en otros modelos animales entre los que se incluye al ratón PCD, la afectación del cerebelo puede provocar la aparición de alteraciones en todas estas funciones (Landis y Mullen, 1978; Goodlett *et al.*, 1992; Le Marec y Lalonde, 1997; Tuma *et al.*, 2015; Díaz *et al.*, 2018; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Además, dichas alteraciones se han detectado en personas con CONDCA, portadoras de una mutación análoga a la de los ratones PCD (Shashi *et al.*, 2018; Sheffer *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021).

No solo eso, sino que el cerebelo también aparece como una estructura clave en la comprensión de trastornos del neurodesarrollo, como el trastorno del espectro autista (Fatemi *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2012), donde se observan alteraciones cerebelosas caracterizadas por una pérdida de las células de Purkinje (Fatemi *et al.*, 2012; Bozdagi *et al.*, 2013). Conviene recordar que estas neuronas constituyen una pieza clave en el funcionamiento del cerebelo al recoger e integrar toda la información de la corteza cerebelosa. De este modo, la pérdida selectiva de las células de Purkinje puede ser responsable de las dificultades para la ejecución de movimientos complejos en las personas con trastornos del espectro autista, así como de sus problemas a la hora de relacionarse socialmente.

Las pruebas de comportamiento motor, cognitivo y social también permitieron evaluar si existe un efecto neuroprotector de rhIGF-1 sobre la neurodegeneración de las células de Purkinje en el ratón PCD. Desafortunadamente, no encontramos mejoras en ninguna de las pruebas realizadas: ni en las que evaluaron la memoria de reconocimiento, ni el comportamiento social, ni tampoco en las de coordinación motora. En todas ellas, los ratones mutantes tratados con rhIGF-1 se comportaban de forma similar a los ratones PCD sin tratar. Tras el sacrificio de los animales a P30, analizamos la supervivencia de células de Purkinje. En este caso, tampoco encontramos diferencias entre los ratones mutantes tratados con rhIGF-1 y los ratones PCD sin tratar, por lo que podemos confirmar que el tratamiento con rhIGF-1 no ejerce un efecto neuroprotector sobre la degeneración cerebelosa presente en los ratones PCD y, por tanto, tampoco recupera las funciones cerebelosas alteradas. Por su parte, no encontramos diferencias en ninguna de las variables analizadas en los ratones PCD debidas al efecto de las inyecciones continuas. Por ello, podemos descartar la influencia del estrés en todos estos resultados, tal y como se ha descrito en otras ocasiones (Du Preez *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022; Ryabinin *et al.*, 1999).

Si atendemos a la bibliografía existente, nuestros datos resultan bastante sorprendentes. En múltiples estudios se ha mostrado una mejora en la función motora tras el tratamiento con IGF-1 en modelos animales con ataxia causada por diferentes etiologías (Hantai *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996; Contreras *et al.*, 1997; Saatman *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1998; Markowska *et al.*, 1998; Fernández *et al.*, 1999; Carro *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2022). De forma más específica, varios autores indican una mejora en la ataxia de los ratones PCD tras el tratamiento con IGF-1, que se traduce en una mejor coordinación motora. Sin embargo, en estos trabajos no se mencionó la protección de las células de Purkinje en el cerebelo (Carro *et al.*, 2001; Carrascosa *et al.*, 2004).

Así pues, no está claro si los efectos *in vivo* se dan rescatando las neuronas que degeneran o modulando la función de las supervivientes (Nahm *et al.*, 2003). En todo caso, nuestros resultados difieren de los publicados previamente, ya que no encontramos efectos histológicos –mediante un rescate de la densidad celular– ni funcionales –mediante la mejora de la realización de las pruebas de comportamiento– tras el tratamiento con IGF-1. Sin embargo, existe un estudio que apoya nuestros resultados: en 2003 Nahm *et al.* mostraron que la administración exógena de IGF-1 no previno ni rescató la muerte de las células de Purkinje en su modelo de neurodegeneración cerebelosa asociada a mutaciones en los canales de calcio (Nahm *et al.*, 2003). Esto sugiere que las mejoras en la locomoción observadas en los estudios previos tras el tratamiento con IGF-1 puedan deberse a una mejora a nivel extracerebeloso o a través de las células de Purkinje supervivientes, como se sugirió anteriormente. En el caso de las mejoras a nivel extracerebeloso, sabemos que el IGF-1 es captado por las neuronas de la oliva inferior y transportado a través de las fibras trepadoras hasta las células de Purkinje (Nieto-Bona *et al.*, 1993; Carro *et al.*, 2000). Por ello, no solo es necesario mantener unas concentraciones óptimas de IGF-1 en el cerebelo, sino que también parece importante que este sea transportado desde la oliva inferior a las células de Purkinje (Fernández *et al.*, 1998). En el caso de la segunda opción, es decir, la recuperación del comportamiento motor mediante la mejora de las neuronas supervivientes, todo apunta a que el IGF-1 no rescata las células de Purkinje que están muriendo (Nahm *et al.*, 2003), si no que los distintos resultados obtenidos sugieren que este tratamiento es más efectivo cuando comienza en etapas preneurodegenerativas, ejerciendo un efecto protector y no de rescate neuronal. Quizás con otra pauta de administración más prematura los resultados obtenidos hubiesen sido más satisfactorios. Desgraciadamente, la variación de los niveles de IGF-1 a lo largo de la etapa degenerativa cerebelosa del ratón PCD nos hizo desechar *a priori* esta posibilidad.

Por otro lado, el IGF-1, como muchos otros péptidos, tiene una vida media corta y se elimina rápidamente del torrente sanguíneo tras la administración sistémica (Torrado y Carrascosa, 2003). Esta eliminación se compensa mediante la unión de IGF-1 con proteínas de unión a IGF1 (IGFBPs³¹), que lo trasladan de un lugar a otro a través de la sangre.

³¹ Del inglés *Insulin-like Growth Factor Binding Protein*

Esta puede ser otra explicación de por qué nuestro tratamiento muestra diferencias con respecto a otros estudios. La eliminación más o menos rápida depende de la dosis y el tipo de formulación. Así, cuando administramos IGF-1 sin encapsular, las IGF-BPs lo captan rápidamente y se saturan, haciendo que lo que no queda unido a estas se degrade (Daughaday y Rotwein, 1989; Carrascosa *et al.*, 2004).

En resumen, a pesar de que hay cierta evidencia de que IGF-1 produce un efecto neuroprotector sobre la degeneración cerebelosa, nuestros datos no mostraron mejoras significativas. Por ello, no continuamos realizando más análisis con este factor neurotrófico.

EL rhVEGF-B EJERCE UN EFECTO NEUROPROTECTOR EN EL RATÓN PCD

El *screening* de factores neurotróficos llevado a cabo en el primer objetivo mostró una alteración en los niveles de VEGF-B tanto a nivel génico como proteico en el ratón PCD. Por ello, el siguiente objetivo de la presente Tesis Doctoral consistió en comprobar si el tratamiento farmacológico con este factor neurotrófico producía una mejora del estado neurodegenerativo del ratón PCD. Para ello, teniendo en cuenta la bibliografía existente, según la que la administración de rhVEGF-B se encuentra espaciada en el tiempo (Arjunan *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2016), el proceso degenerativo de los ratones mutantes (Baltanás, Casafont, Weruaga, *et al.*, 2011; Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007), y los cambios encontrados en el primer objetivo de este proyecto, administramos rhVEGF-B cada dos días, desde P10 –cinco días antes del comienzo de los cambios génicos y proteicos–, hasta P20. Adicionalmente, tras constatar los resultados positivos encontrados con esta pauta de administración, decidimos probar con otra en la que lo administramos diariamente a lo largo de las mismas edades descritas. El efecto neuroprotector de los tratamientos se analizó mediante pruebas de comportamiento motor, cognitivo y social, así como con análisis histológicos. De esta manera, pudimos comprobar que la pauta óptima de administración era cada dos días. Basándonos en ella y en último lugar, dimos un paso más en el estudio de las bases de la neuroprotección ejercida por rhVEGF-B, mediante el análisis del estado del músculo esquelético tras el tratamiento, así como su efecto sobre la calidad mitocondrial.

Efecto de rhVEGF-B sobre el peso corporal

En primer lugar, analizamos el peso corporal de los ratones de los cuatro grupos experimentales usados, tanto para el tratamiento cada dos días como para el diario. Como apuntamos anteriormente, notamos una clara reducción en el peso corporal en los ratones PCD en comparación con los ratones WT, que aumenta a medida que avanza la neurodegeneración, tal y como se había descrito anteriormente (Mullen *et al.*, 1976; Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007). Por otro lado, no encontramos diferencias en el peso entre los ratones PCD estándar, los tratados con NaCl y los tratados con rhVEGF-B –ya sea continuo o cada dos días–. Así, pudimos constatar que el tratamiento con rhVEGF-B no produce efectos sobre el peso corporal y que la administración continua tampoco ocasiona cambios en estos animales, tal y como se ha reportado en otras ocasiones (Ryabinin *et al.*, 1999; Du Preez *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). La ausencia de efectos a este nivel es fácilmente explicable, ya que, a diferencia de otros factores neurotróficos como el IGF-1 (Laron, 2001; Yakar y Adamo, 2012), el VEGF-B no ejerce un efecto directo sobre el crecimiento de los tejidos, sino que este se relaciona con la neuroprotección (Sun *et al.*, 2006; X. Li *et al.*, 2008; Poesen *et al.*, 2008; Falk *et al.*, 2009; Yue *et al.*, 2014) y la regulación de la calidad mitocondrial (Olsson *et al.*, 2006; X. Li *et al.*, 2008; Falk *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2014), tal y como veremos más adelante.

El rhVEGF-B mejora el comportamiento motor, cognitivo y social del ratón PCD

Para evaluar el efecto neuroprotector del tratamiento con rhVEGF-B cada dos días, llevamos a cabo el estudio de las capacidades motoras, cognitivas y sociales a lo largo del tratamiento, a P17, P25 y P30. La administración de rhVEGF-B provocó una mejora de todas las funciones analizadas. En primer lugar, a P17 encontramos una recuperación total de la capacidad motora medida mediante el test *Rotarod*, siendo esta similar a la de los ratones WT. Sin embargo, en edades posteriores, los ratones mutantes tratados mantuvieron una motricidad intermedia entre los animales WT y los PCD sin tratar, aunque no observamos una mejora progresiva debido al aprendizaje, tal y como ocurre generalmente en los ratones WT (Buitrago *et al.*, 2004). Estos resultados son comparables a lo observado en modelos animales de Parkinson, en los que el tratamiento preventivo con rhVEGF-B mejoró el comportamiento motor (Falk *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014). Asimismo, el tratamiento también consiguió recuperar completamente alguna de las funciones alteradas en el modelo PCD, como la memoria de reconocimiento y la preferencia social. Ambas funciones se mantuvieron similares a las de los ratones WT hasta P30.

Nuestros datos ponen de manifiesto por primera vez el efecto neuroprotector del tratamiento con rhVEGF-B sobre el comportamiento atáxico, cognitivo y social, ya que, hasta el momento, no había estudios que mostrasen este efecto neuroprotector en modelos de ataxia cerebelosa o de otras alteraciones cognitivo-afectivas. Como veremos a continuación, estos resultados se corresponden con la ralentización de la muerte neuronal en el cerebelo de los ratones PCD.

El tratamiento con rhVEGF-B produce un efecto neuroprotector sobre las células de Purkinje

Para comprobar el efecto del tratamiento con rhVEGF-B cada dos días sobre la viabilidad de las células de Purkinje, llevamos a cabo un análisis de la densidad de este tipo de neuronas y de las células apoptóticas a P30. Dados los resultados obtenidos, decidimos repetirlo cinco días antes (a P25) para entender mejor los pormenores de la mejora encontrada, así como de su extensión temporal. En todo caso, para facilitar la discusión de estos datos, los describiremos de forma cronológica.

El análisis de la supervivencia de células de Purkinje tras el tratamiento con rhVEGF-B mostró una densidad neuronal similar a la de los ratones WT a P25. Sin embargo, a P30, a pesar de que encontramos un aumento considerable del número de células de Purkinje en los ratones tratados frente a los mutantes PCD, la densidad neuronal fue significativamente menor que en los ratones WT. Por tanto, la protección inicial no se mantuvo en el tiempo de una forma indefinida. En cualquier caso, nuestros datos concuerdan con lo observado en otros modelos de neurodegeneración. En modelos animales de Parkinson, varios estudios han mostrado el efecto neuroprotector de VEGF-B, ya que describen tras el tratamiento un aumento en la densidad neuronal acompañada de la mejora en el comportamiento (Falk *et al.*, 2009; Falk *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha demostrado el efecto neuroprotector de VEGF-B en modelos de ELA, ya que aumenta la densidad de las motoneuronas que tienden a morir por esta enfermedad (Poesen *et al.*, 2008). Además, el VEGF-B también ejerce un papel neuroprotector en la reparación de los nervios periféricos tras una lesión traumática, por lo que sus efectos protectores no solo se encuentran en el SNC (Guaiquil *et al.*, 2014).

En cuanto al alcance temporal de los efectos del rhVEGF-B, nuestros datos sugieren que la neuroprotección ejercida se produce mientras se da el tratamiento, al menos a nivel subcelular (ver más adelante).

Dichos efectos parecen prolongarse un poco más, ya que a P25, a pesar de que el tratamiento ha finalizado, todavía encontramos un efecto neuroprotector evidente. Por el contrario, a P30, al haber pasado diez días desde la finalización del tratamiento, y debido a la rápida y agresiva degeneración asociada a la mutación *pcd* (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007; Baltanás, *et al.*, 2011a), la muerte de las células de Purkinje vuelve a ser evidente, aunque de forma atenuada o retardada. Por otro lado, sabemos que los efectos protectores de VEGF-B son preventivos. Los estudios realizados en modelos animales de Parkinson mostraron que la administración de VEGF-B antes del comienzo de los daños producía una mejora en el comportamiento, así como en la densidad celular. Sin embargo, la administración tras el comienzo de la degeneración no va acompañada de una protección celular (Yue *et al.*, 2014). Por tanto, puesto que el tratamiento comenzó a P10, es decir, antes del comienzo de la muerte neuronal, observamos una mejora en los ratones PCD. Sin embargo, esto no se mantiene en el tiempo, por lo que sería interesante evaluar tratamientos más prolongados o repetidos para conocer sus efectos en pleno proceso de muerte celular.

A pesar de que no se conoce el mecanismo por el cual VEGF-B ejerce su acción neuroprotectora, esta parece estar relacionado con la activación del receptor VEGFR1, que se expresa en las neuronas (Poesen *et al.*, 2008; Dhondt *et al.*, 2011). Como posibles efectos protectores se encuentran la inhibición de la apoptosis o la mejora del funcionamiento mitocondrial (Sun *et al.*, 2006; X. Li *et al.*, 2008; Falk *et al.*, 2010), factores que decidimos evaluar en lo concerniente al cerebelo.

Dada la relación entre el VEGF-B y la supresión de la muerte celular, decidimos realizar un estudio de apoptosis en la capa de las células de Purkinje. A P25 encontramos un aumento en la densidad de las células apoptóticas en ambos grupos experimentales PCD (tratados y sin tratar). Este aumento fue mayor en ratones PCD sin tratar, encontrándose los ratones tratados a mitad de camino entre los grupos WT y PCD. En cambio, a P30, vimos que las células apoptóticas aumentaban considerablemente en los ratones mutantes tratados con rhVEGF-B, obteniendo valores más altos que en ratones WT y PCD sin tratar. Estos datos sugieren que el efecto neuroprotector de VEGF-B se da mediante una inhibición parcial o un retraso de la apoptosis (Y. Li *et al.*, 2008), al menos, hasta P25. Esto puede estar ocurriendo por varios motivos.

En primer lugar –de forma similar a lo explicado anteriormente–, podemos estar ante un efecto neuroprotector residual del tratamiento, ya que este termina a P20. Por otro lado, el aumento de apoptosis observado a P30 en los ratones tratados puede ser debido a que encontramos una mayor densidad celular gracias a la neuroprotección conseguida anteriormente. En los ratones PCD, el porcentaje de células de Purkinje es muy reducido, y la mayoría de estas se localizan en el lóbulo X, ya que exhibe cierta resistencia a la neurodegeneración (Wang y Morgan, 2007; Baltanás, *et al.*, 2011a; Martín *et al.*, 2019; Hernández-Pérez *et al.*, 2023). Así, puesto que en los ratones tratados estamos retrasando la muerte, encontramos una mayor densidad de células de Purkinje susceptibles de sufrir daños en el DNA y de continuar su proceso de degeneración, lo que se traduce en un aumento del marcaje de apoptosis mediante la técnica TUNEL. Por último, la degeneración neuronal observada en los ratones PCD es muy rápida y agresiva (Mullen *et al.*, 1976; Wang y Morgan, 2007; Baltanás, *et al.*, 2011a), lo que reduciría la franja temporal en la que observar células de Purkinje apoptóticas en los ratones sin tratar. Así, el tratamiento puede estar frenando la velocidad de muerte neuronal, permitiendo observar un mayor número de células apoptóticas en edades avanzadas de la neurodegeneración. En esta línea, otros tratamientos probados en ratones PCD muestran algo similar: tras el tratamiento con el endocannabinoide oleiletanolamida los ratones mutantes exhiben una neuroprotección parcial a P30 que se va reduciendo hasta la muerte completa de las células de Purkinje a P40 (Pérez-Martín *et al.*, 2021; Pérez-Martín, 2022).

Finalmente, en todos los estudios histológicos realizados, tanto aquellos en los que analizamos la supervivencia celular como la apoptosis, no encontramos diferencias cuando analizamos el lóbulo X entre grupos experimentales. Esto se debe a la neurorresistencia que exhibe este lóbulo, apreciándose en todos los grupos de PCD una densidad celular similar a la de los ratones WT, al menos hasta P30 (Baltanás, *et al.*, 2011a; Hernández-Pérez *et al.*, 2023).

En resumen, la administración de rhVEGF-B retrasa la muerte de las células de Purkinje, provocando una mejora parcial en la coordinación motora y una mejora total en las funciones cognitivas y sociales, aunque estos efectos parecen disminuir conforme avanza la neurodegeneración.

La administración excesiva de rhVEGF-B puede tener efectos deletéreos

Una vez comprobados los efectos neuroprotectores de rhVEGF-B sobre la neurodegeneración cerebelosa tras el tratamiento cada dos días, y puesto que no hay bibliografía suficiente sobre la pauta óptima de administración de este factor neurotrófico, tratamos a un nuevo grupo de animales con rhVEGF-B diariamente en las mismas edades descritas, desde P10 a P20, de forma similar a las pautas de tratamiento con otros factores neurotróficos, como IGF-1 (Castro *et al.*, 2014; Puche *et al.*, 2016; Song *et al.*, 2018). Adicionalmente, usamos el grupo de ratones tratados con NaCl para comprobar el efecto de las inyecciones diarias sobre los animales a esta edad temprana (Morton *et al.*, 2001).

Al igual que con el otro tratamiento con rhVEGF-B, para evaluar los efectos neuroprotectores realizamos pruebas de comportamiento y analizamos la densidad de células de Purkinje. En este caso no encontramos una mejora en ninguna de las variables analizadas tras el tratamiento diario con rhVEGF-B. En primer lugar, en la realización de las pruebas de comportamiento motor, cognitivo o social, los ratones tratados diariamente mostraron unos resultados similares a los ratones PCD. Además, tampoco encontramos diferencias en el análisis de la supervivencia celular, sino que, al contrario de lo esperado, en los ratones tratados diariamente con rhVEGF-B, la densidad celular fue similar a los ratones PCD sin tratar. Por su parte, el tratamiento con NaCl mostró que estos resultados tampoco se debían al efecto negativo de la administración continua y diaria (Ryabinin *et al.*, 1999; Du Preez *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). En ocasiones, una frecuencia o dosis de administración alta de un determinado tratamiento puede no ser tolerable o ser mejor o peor que otras frecuencias o dosis más bajas (Harvey *et al.*, 2022). Es decir, el efecto beneficioso de rhVEGF-B con respecto a la cantidad administrada parece presentar la típica curva en forma de U invertida. Otros tratamientos farmacológicos en el ratón PCD han mostrado un comportamiento similar. Tal es el caso de la oleiletanolamida, que no provocó mejoras en la densidad de las células de Purkinje en los ratones PCD sometidos a un tratamiento crónico, mientras que las dosis más espaciadas o incluso únicas fueron mucho más efectivas (Muñoz-Castañeda, 2015; Pérez-Martín *et al.*, 2021). En el caso de los factores neurotróficos, una posible explicación a los resultados obtenidos es que, en ocasiones, un aumento excesivo de estos factores puede tener un efecto deletéreo sobre el desarrollo y supervivencia celular (Miquerol *et al.*, 2000). Por ello, es de vital importancia la regulación precisa de la administración de este tipo de sustancias.

A tenor de los resultados obtenidos, comprobamos que duplicar la tasa de administración del rhVEGF-B no optimizaba su efecto sobre la neurodegeneración del ratón PCD, por lo que determinamos que el tratamiento más efectivo con esta sustancia era cada dos días. Así pues, continuamos profundizando en la causa de la mejora ejercida por el rhVEGF-B solo en el caso de la pauta de administración beneficiosa.

El tratamiento con rhVEGF-B no produce mejoras en el músculo esquelético

Las ataxias cerebelosas, además de estar asociadas a una problemática de daño neuronal primario, causan una atrofia muscular secundaria (Milne *et al.*, 2016). Por tanto, la mejora funcional de los ratones tratados podría encontrarse no solo en la atenuación de la muerte de las células de Purkinje, sino también fuera del encéfalo. Además, estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la mejora en la capacidad motora de los ratones PCD tras un tipo de terapia con células de la médula ósea se debe, en gran medida, a una mejora de la capacidad muscular (Díaz *et al.*, 2018). No solo eso, otras publicaciones previas también mostraron una mejora en la capacidad muscular de los ratones PCD tras el tratamiento con factores neurotróficos (Carrascosa *et al.*, 2004). Por todo ello, en el presente trabajo se analizó a P30 el músculo esquelético procedente del cuádriceps de ratones WT, PCD y mutantes tratados con rhVEGF-B. No obstante, en nuestros análisis no encontramos diferencias entre los grupos WT y PCD, ni tampoco hallamos ningún tipo de variación histológica cuando analizamos las fibras musculares de los animales tratados con rhVEGF-B. Estas diferencias con los estudios mencionados anteriormente pueden deberse a que la alteración de las fibras musculares en los ratones PCD se detectó a edades mucho más avanzadas que las analizadas en la presente Tesis Doctoral (Carrascosa *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2018).

Por lo tanto, nuestros datos apoyan una ausencia del efecto de la mutación sobre la morfología muscular en etapas tempranas de la neurodegeneración (al menos hasta P30) y, además, sugieren que la mejora en el comportamiento de los ratones mutantes tras el tratamiento sea casi exclusiva del aumento de la densidad neuronal en el cerebelo. En nuestro laboratorio ya se había detectado una mejora en el comportamiento motor de los ratones PCD atribuida de forma casi exclusiva a una recuperación de la degeneración cerebelosa gracias a otro tipo de tratamiento farmacológico (Pérez-Martín *et al.*, 2021), lo que apoya nuestra hipótesis.

Análisis de la disfunción mitocondrial en el ratón PCD

Varios estudios han demostrado que el ratón mutante PCD sufre una alteración mitocondrial tanto morfológica como funcional (Chakrabarti *et al.*, 2009; Chakrabarti *et al.*, 2010; Gilmore-Hall *et al.*, 2019). Por ello, en la presente Tesis Doctoral, hemos llevado a cabo el análisis de las mitocondrias de los ratones mutantes para conocer en mayor detalle la extensión temporal de las alteraciones asociadas a la mutación *pcd*, así como para evaluar una posible recuperación funcional de estas tras el tratamiento con rhVEGF-B.

Efecto de la mutación *pcd* sobre la calidad mitocondrial

Una de las preguntas más relevantes en el campo de las enfermedades neurodegenerativas es por qué distintas poblaciones neuronales degeneran de forma diferente. En los últimos años se ha demostrado que la calidad mitocondrial desempeña un papel fundamental en el comienzo y la progresión rápida de ciertas enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (González-Rodríguez *et al.*, 2022). Así pues, parece que en la mayoría de estas enfermedades la disfunción mitocondrial es el principal factor implicado en el progreso de la patología, pudiendo exacerbar la muerte neuronal (Wang *et al.*, 2019). En este sentido, el ratón mutante PCD ofrece la oportunidad de investigar estos aspectos, ya que sufre una rápida y drástica neurodegeneración de las células de Purkinje (Mullen *et al.*, 1976).

Estudios previos han demostrado alteraciones mitocondriales en los ratones PCD durante el proceso degenerativo, tanto a nivel morfológico (Chakrabarti *et al.*, 2010), como en la disminución de las actividades complejas de la cadena respiratoria (Chakrabarti *et al.*, 2009). Sin embargo, actualmente no se conoce cuándo se produce el comienzo de dicha disfunción mitocondrial en este modelo animal. Determinar el momento de origen es de gran importancia para establecer una ventana temporal óptima de tratamientos, para intentar mejorar la función mitocondrial de forma preventiva antes del comienzo de su disfunción.

Para realizar este estudio, analizamos varios marcadores de la calidad mitocondrial a P10 (antes del comienzo de la neurodegeneración, cuando no se observa ningún signo degenerativo), a P15 (momento en el que comienza la preneurodegeneración) y a P25 (edad en la que la degeneración es patente; Mullen *et al.*, 1976). Los marcadores fueron MTCO1, PCx y SHMT2.

En primer lugar, MTCO1 es la subunidad I de la enzima citocromo c oxidasa, una de las tres subunidades codificadas por el DNA mitocondrial del complejo IV. El complejo IV se localiza dentro de la membrana mitocondrial y es la tercera y última enzima de la cadena transportadora de electrones de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Por lo tanto, con el análisis de la expresión de MTCO1 analizamos la capacidad de fosforilación oxidativa de la mitocondria (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17708>). Un fallo en este proceso provoca un desequilibrio redox y un aumento de las especies reactivas de oxígeno (Motori *et al.*, 2020). Por su parte, PCx es una enzima que cataliza la conversión de piruvato – derivado de la glucosa– en oxalacetato (Utter y Keech, 1963). Es una enzima anaplerótica clave, ya que interviene en mantener la concentración suficiente de los diversos componentes del ciclo de Krebs (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5091>). Finalmente, SHMT2 es una enzima que cataliza la reacción reversible de serina y tetrahidrofolato a glicina, por lo que es la principal responsable de la síntesis de este último aminoácido (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6472>). Tanto PCx como SHMT2 son piezas fundamentales en la respuesta al estrés mitocondrial, por lo que alteraciones en su expresión nos dan información sobre el estado de estos orgánulos (Suomalainen y Battersby, 2018; Kiesel *et al.*, 2021). La inducción de esta respuesta al estrés inicia señales en las mitocondrias, que activan factores de transcripción para el mantenimiento de estos orgánulos y la mejora del control de calidad de su actividad (Suomalainen y Battersby, 2018).

Comenzando con la edad de P10, encontramos en los ratones PCD una reducción de la fosforilación oxidativa –medida a través de los niveles de MTCO1–, así como un aumento de las proteínas de respuesta al estrés mitocondrial –PCx y SHMT2–. Por lo tanto, observamos una expresión en los marcadores de disfunción mitocondrial antes del comienzo de la degeneración neuronal. Debemos recordar que el comienzo de la predegeneración se estima a P15, cuando se observan cambios citológicos y nucleares en las células de Purkinje, sin que se detecte su muerte (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Sorprendentemente, nuestros datos indican que las alteraciones mitocondriales ya se dan desde P10, es decir, 5 días antes. De hecho, en un estudio en el que se analizó el perfil transcripcional del ratón con la mutación *pcd^{6j}* se demostró un aumento de la expresión de genes proapoptóticos, y una disminución de los genes relacionados con el desarrollo y la migración neuronal a P14 (Ford *et al.*, 2008).

No solo eso, sino que la disfunción mitocondrial parece ser el comienzo de muchas enfermedades neurodegenerativas, siendo esta alteración mucho anterior al comienzo de los síntomas o la muerte neuronal (Motori *et al.*, 2020). En este sentido, la marcada disfunción de la fosforilación oxidativa que encontramos antes del comienzo de la neurodegeneración parece explicar la rápida degeneración neuronal de los ratones PCD (Motori *et al.*, 2020). A pesar de que son necesarios más estudios para conocer el momento exacto del comienzo de los cambios mitocondriales, así como su extensión, nuestros datos apoyan que se estime el inicio de la preneurodegeneración de las células de Purkinje un tiempo antes, al menos, a P10. Dicho de otro modo, las alteraciones mitocondriales en este modelo de degeneración pueden considerarse uno de los primeros marcadores tempranos de daño (y muerte) neuronal.

Por otro lado, a P15 y P25 observamos algo similar. En ambas edades, se detectó una reducción de la fosforilación oxidativa en los ratones PCD. Sin embargo, el perfil de activación de proteínas de respuesta al estrés cambia. A P15 vemos un aumento del marcaje de PCx y SHMT2 en ratones mutantes, mientras que a P25 únicamente aparece un aumento de SHMT2, ya que el marcaje de PCx se mantiene similar a los ratones WT. Es decir, observamos una disminución del complejo IV de la cadena transportadora de electrones en ratones PCD a todas las edades analizadas. Cuando la cadena respiratoria es disfuncional, los niveles de las especies reactivas de oxígeno pueden aumentar drásticamente, provocando un incremento del estrés celular (Motori *et al.*, 2020). Estudios previos realizados en ratones con degeneración cerebelosa han mostrado que las células de Purkinje reaccionan a la disfunción de la fosforilación oxidativa con una reprogramación metabólica (Motori *et al.*, 2020). En este sentido, observamos un aumento de la expresión de PCx y SHMT2 en las células de ratones PCD, corroborando, por tanto, la existencia de una alteración mitocondrial en las etapas de la degeneración analizadas.

Comenzando con PCx, de forma similar a lo encontrado en otros estudios de neurodegeneración cerebelosa con daño mitocondrial (Motori *et al.*, 2020), encontramos un aumento de su expresión en el soma neuronal en todas las edades analizadas, mientras que en los ratones WT esta enzima se encuentra confinada a la glía de Bergman adyacente (Motori *et al.*, 2020; Waelsch *et al.*, 1964; Yu *et al.*, 1983). A pesar de que aún no se han caracterizado los mecanismos precisos que subyacen a la regulación al alza de PCx en neuronas disfuncionales, este aumento desempeña un papel importante en el mantenimiento del estado redox neuronal como factor protector.

Más aún, reducir los niveles de PCx en células de Purkinje con disfunción mitocondrial provoca un estado más oxidado y acelera la muerte celular (Motori *et al.*, 2020). Uno de los mecanismos por el cual PCx produce una protección frente al mal funcionamiento de las mitocondrias se debe a que este utiliza el piruvato derivado de la glucosa para reponer el oxalacetato en el ciclo de Krebs, que se utiliza para la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos cuando la disponibilidad de estos nutrientes es limitada (Kiesel *et al.*, 2021). Además, el oxalacetato producido también puede contribuir a la protección frente al estrés oxidativo (Ronnebaum *et al.*, 2006) que están sufriendo las células de Purkinje de los ratones mutantes PCD debido a la disfunción de la capacidad oxidativa. El oxalacetato tiene un efecto favorable sobre la biogénesis mitocondrial, ya que aumenta la expresión de factores íntimamente relacionados con la calidad mitocondrial, como la MTCO1 entre otros (Wilkins *et al.*, 2016). Curiosamente, la activación de PCx es un proceso que no se da en tejidos periféricos con disfunción mitocondrial, por lo que este mecanismo parece ser una característica única de las neuronas con deficiencias en la fosforilación oxidativa, con implicaciones muy importantes en la neurodegeneración (Kühl *et al.*, 2017; Motori *et al.*, 2020).

Con todo, a P25 no encontramos un aumento de expresión de PCx en los ratones PCD. Esto puede estar relacionado con la rápida degeneración neuronal que encontramos en los ratones mutantes a esta edad. Así, aunque que la respuesta al estrés se activa al menos desde P10, puede que esta no sea suficiente para paliar la suma de daños que sufren las células de Purkinje (adicionalmente a los mitocondriales), de manera que estas neuronas dejen de tener la plasticidad que las caracteriza porque terminan abocadas a un proceso de muerte neuronal (Motori *et al.*, 2020). Además, a pesar de que la respuesta al estrés mitocondrial está más caracterizada en tejidos periféricos, sabemos que progresa en diversas etapas temporales (de forma temprana a crónica; Forsström *et al.*, 2019), albergando varias fases de activación que implican una amplia remodelación transcripcional y metabólica (Nikkanen *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2017). De este modo, la variación de los niveles de PCx en los ratones PCD a P15 y a P25 puede responder simplemente a un cambio en el patrón de expresión normal de esta proteína. Por ello, en dichos mutantes veríamos una activación de PCx ya desde antes del comienzo de la degeneración (cuando aparecen los primeros daños mitocondriales), pero también una inactivación posterior cuando la enfermedad se hace más grave y crónica.

Finalmente, también observamos un aumento de SHMT2 tanto a P15 como a P25. En células con daños en el DNA mitocondrial existen factores de transcripción que desencadenan una robusta respuesta al estrés mitocondrial, con especial interés en el ciclo del folato mitocondrial, que se encuentra generalmente inducido en tejidos afectados (Fenech, 2012; Fan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020). SHMT2 es una enzima clave en dicho ciclo del folato mitocondrial, una red metabólica interconectada que sirve para activar y transferir unidades de carbono en muchos procesos bioquímicos, incluyendo la síntesis de purina, la traducción mitocondrial de proteínas y la regeneración de metionina, muy importantes en diversas funciones celulares como la proliferación celular, la síntesis de proteínas y la respiración mitocondrial (Xiu y Field, 2020). Varios estudios han mostrado que el correcto funcionamiento de este ciclo es importante para el ensamblaje de los complejos de la cadena transportadora de electrones y, por tanto, para la correcta fosforilación oxidativa (Morscher *et al.*, 2018). Por tanto, el ciclo del folato se encuentra inducido ante un daño mitocondrial ya que puede estimular la fosforilación oxidativa a través de varios mecanismos, influyendo sobre la biosíntesis de nucleótidos y, por tanto, la replicación del DNA mitocondrial (Anderson *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2016), la expresión de mRNA de los genes de la cadena transportadora de electrones (Mentch *et al.*, 2015; Kottakis *et al.*, 2019), la biosíntesis de las proteínas de la cadena transportadora de electrones codificados por las mitocondrias (Azize *et al.*, 2014; Morscher *et al.*, 2018) y la regulación del estado redox celular (Fan *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2020). Todo ello puede generar una respuesta ante el daño mitocondrial existente, como un mecanismo de defensa para evitar la progresión de la enfermedad. Precisamente, la inhibición de las vías comentadas anteriormente provoca una degeneración mucho más acelerada de las células de Purkinje (Motori *et al.*, 2020). En este sentido, nuestros resultados indican que las células de Purkinje de los ratones PCD presentan un alto grado de plasticidad metabólica *in vivo* al manifestar el aumento de estas enzimas con características neuroprotectoras. De hecho, en nuestro laboratorio ya se ha demostrado el incremento –al menos transitorio– de las proteínas neuroprotectoras HSP25 y HSP25-P en el cerebelo del ratón PCD ante su proceso degenerativo (Hernández-Pérez, 2022). En todo caso, el incremento de expresión de SHMT2 no parece ser suficiente para parar la rápida y agresiva muerte neuronal que caracteriza al ratón PCD. Por ello, es de gran importancia el punto de inicio de los tratamientos farmacológicos, incluso antes de P10, para evitar en la medida de lo posible el comienzo de la disfunción mitocondrial y las respuestas ante estrés oxidativo, minimizando el sufrimiento de las células de Purkinje en busca de su protección.

El rhVEGF-B ejerce un efecto neuroprotector sobre la disfunción mitocondrial

Una de las funciones de VEGF-B es el mantenimiento de un correcto funcionamiento mitocondrial (Olsson *et al.*, 2006; Falk *et al.*, 2010; Hagberg *et al.*, 2010; Dhondt *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014). Por ello, analizamos los marcadores mencionados anteriormente (MTCO1, PCx y SHMT2) también en ratones mutantes a los que se les administró rhVEGF-B para comprobar si el tratamiento produce efectos beneficiosos en la calidad mitocondrial.

Los análisis realizados a P25 mostraron unos niveles de MTCO1 similares a los de los ratones WT. Por su parte, la respuesta al estrés mitocondrial mediada por PCx y SHMT2 sigue activa, siendo mayor que en los ratones WT y también que en los PCD en el caso de PCx.

En primer lugar, tras el tratamiento observamos una recuperación de la capacidad de fosforilación oxidativa medida con MTCO1. Este aumento de MTCO1 tras el tratamiento puede deberse a que VEGF-B aumenta la expresión PGC-1 α ³² (Mehlem *et al.*, 2016), regulador central dentro de la función mitocondrial y que proporciona un efecto protector en neuronas que se debe a varios motivos. En primer lugar, PGC-1 α produce un aumento de la captación de ácidos grasos de cadena larga a través de FATP1³³ y FATP4, mejorando la función mitocondrial y reduciendo la lesión oxidativa, ya que esta activación genera más ATP y disminuye las especies reactivas de oxígeno, promoviendo la protección neuronal (Caballero *et al.*, 2017). Por otro lado, PGC-1 α activa los factores de transcripción NRF1³⁴ y NRF2 (Corona y Duchon, 2015), que tienen un efecto potenciador de la biogénesis mitocondrial (Rowe *et al.*, 2010). Esto sugiere que VEGF-B está regulando directamente la PGC-1 α seguida por un aumento de la actividad mitocondrial, o bien que VEGF-B está aumentando la actividad mitocondrial, lo que produce una activación de PGC-1 α con el fin de mantener una mayor producción de ATP (Caballero *et al.*, 2017).

En paralelo, el tratamiento con rhVEGF-B no redujo la respuesta al estrés mitocondrial mediada por PCx, sino que, al contrario, encontramos un aumento de este marcador en comparación con ratones WT y PCD. Por su parte, SHMT2 se mantuvo similar a los ratones PCD, encontrando un aumento con respecto a ratones WT.

³² Del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1- α*

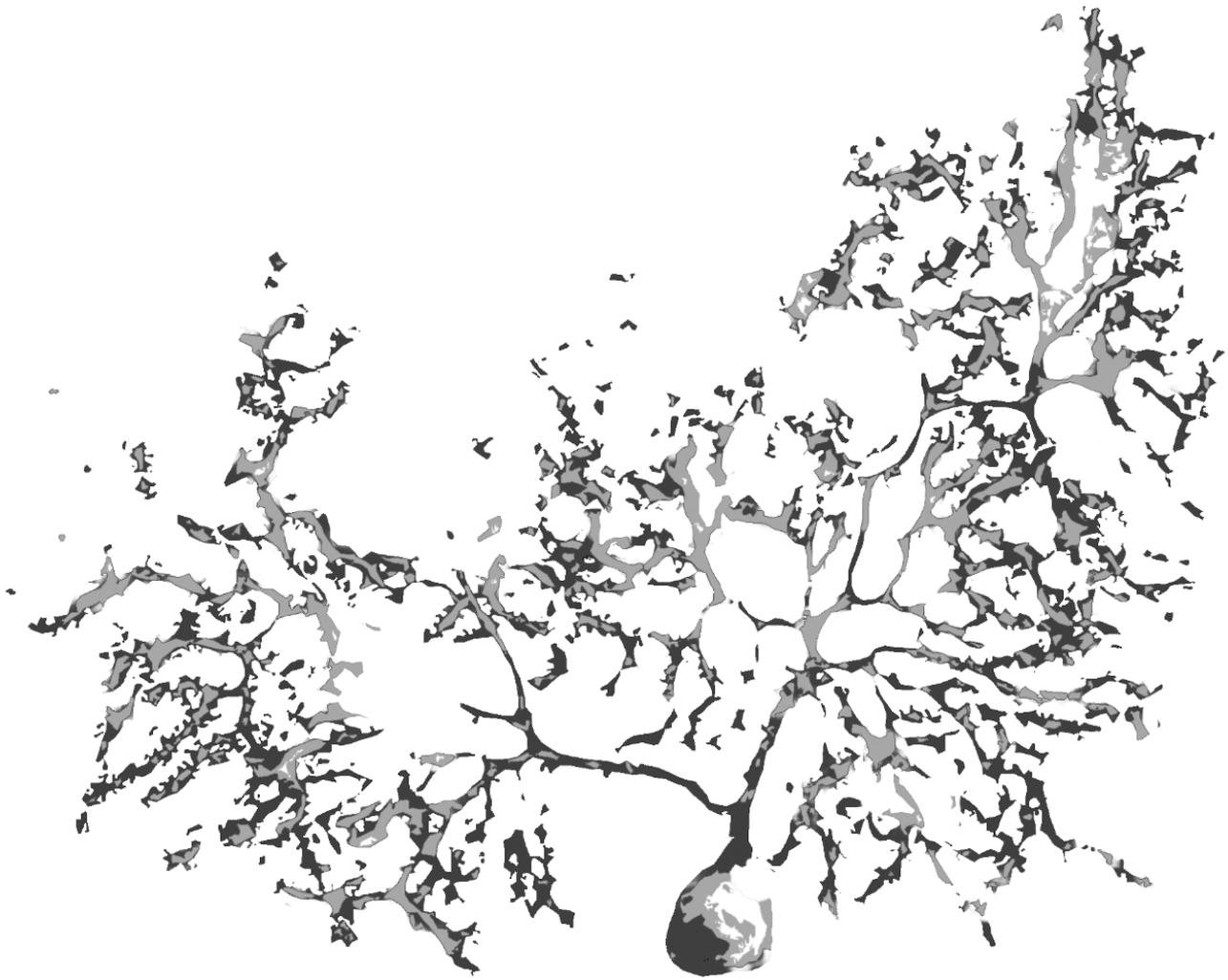
³³ Del inglés *Fatty Acid Transport Protein*

³⁴ Del inglés *Nuclear Respiratory Factors*

Puesto que el tratamiento con rhVEGF-B recupera los niveles de MTCO1, a la vez que PCx y SHMT2 aumentan en respuesta a las deficiencias en la fosforilación oxidativa, este aumento global en las proteínas de respuesta al estrés puede deberse a dos situaciones no excluyentes. En primer lugar, es posible que, a pesar de encontrar una mayor densidad de mitocondrias, no restauremos la funcionalidad de estas, por lo que sigue siendo necesaria la activación de los distintos mecanismos de respuesta al estrés de PCx y SHMT2. Por otro lado, puede que esta respuesta no se extinga tras el tratamiento. Actualmente, sabemos que la respuesta al estrés mitocondrial progresa en distintas etapas temporales (Forsström *et al.*, 2019); sin embargo, no se conocen los mecanismos que subyacen a la activación o inhibición de estas respuestas. Puesto que el tratamiento comenzó a P10, es decir, cuando MTCO1 ya está afectado y, por tanto, cuando la activación de PCx y SHMT2 ya ha comenzado, la respuesta al estrés mitocondrial puede permanecer activa, sin extinguirse tras la recuperación funcional parcial de las mitocondrias.

Además, encontramos un aumento de PCx en ratones tratados con rhVEGF-B que no encontramos en ratones PCD. Puesto que la activación de las proteínas de respuesta al estrés depende tanto de la gravedad como del momento en el que empieza el daño (Forsström *et al.*, 2019), este incremento sugiere un retraso en la disfunción mitocondrial. Por otro lado, estos datos concuerdan con lo observado en el primer objetivo de esta Tesis Doctoral, donde encontramos un aumento de expresión de VEGF-B a P15 en ratones PCD, que se correspondería con las alteraciones en la fosforilación oxidativa, y un aumento de PCx y SHMT2. Este pico de expresión a P15 parece un proceso de plasticidad celular natural que permitiría a las neuronas paliar temporalmente la disfunción mitocondrial que sufren ya en etapas tempranas. Sin embargo, a P25 no observamos cambios de VEGF-B y, en este caso, vemos como las respuestas al estrés mitocondrial cesan en ratones PCD, probablemente debido a la muerte inminente de las células de Purkinje. Más aun, el tratamiento con rhVEGF-B provoca un aumento de la respuesta al estrés, y, por tanto, un incremento de la plasticidad neuronal que permite paliar –al menos temporalmente– la disfunción mitocondrial.

Por tanto, hemos demostrado que el tratamiento con VEGF-B tiene efectos neuroprotectores sobre el ratón mutante PCD tanto a nivel neuronal como del comportamiento. Además, sabemos que también influye en la funcionalidad mitocondrial, que se encuentra alterada desde antes del comienzo de la neurodegeneración, y este puede ser el origen de la neuroprotección detectada. Dada la capacidad neuroprotectora del VEGF-B, su efecto probado sobre las mitocondrias y el hecho de que estos orgánulos estén comúnmente afectados en procesos degenerativos, parece sensato fomentar su investigación con un punto de vista de aplicabilidad clínica.

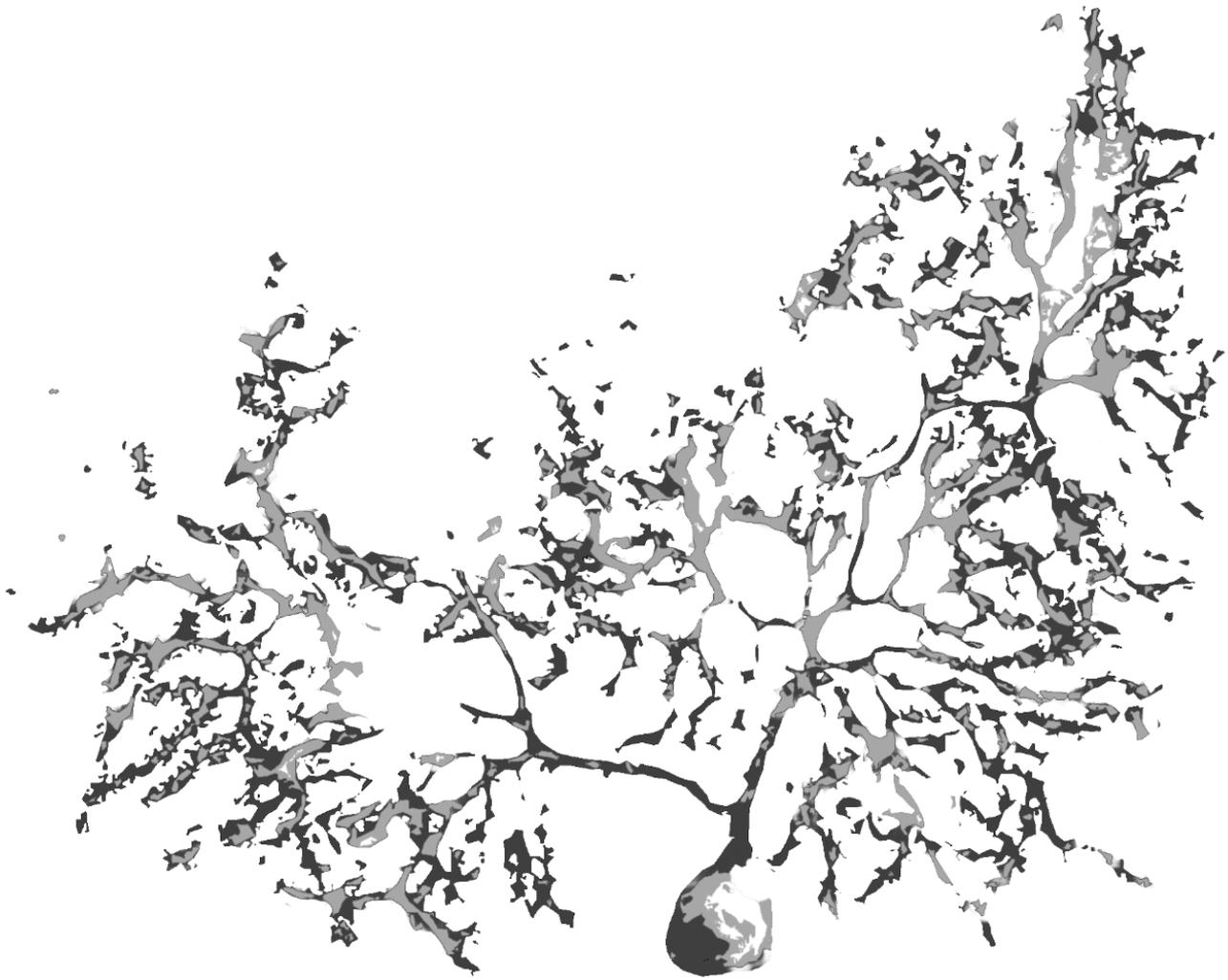


CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, y según los resultados obtenidos y su posterior discusión, hemos llegado a las siguientes **conclusiones**:

- I. Los factores neurotróficos IGF-1 y VEGF-B presentan una expresión alterada en ratones PCD. Sus fluctuaciones anómalas se relacionan con un momento concreto del proceso degenerativo, siendo VEGF-B fundamental en las etapas tempranas de la neurodegeneración e IGF-1 en las más tardías. **Es decir, el proceso neurodegenerativo de los ratones PCD va acompañado de alteraciones catastróficas en la expresión de factores neurotróficos, que fluctúan específicamente en función de las etapas de dicho proceso.**
- II. El tratamiento con rhIGF-1 tiene como único efecto sistémico el aumento del peso corporal en los ratones PCD. Sin embargo, no ejerce efecto protector en las células de Purkinje, y, en consecuencia, no genera mejora alguna en la realización de las pruebas de comportamiento. **De este modo, el rhIGF-1 resulta ineficaz frente la degeneración cerebelosa del ratón PCD.**
- III. Por el contrario, el tratamiento con rhVEGF-B ejerce un efecto protector sobre las células de Purkinje del ratón PCD, que se traduce en una mejora parcial de las funciones motoras, cognitivas y sociales. Esta neuroprotección se produce, principalmente, mediante la inhibición de la apoptosis y la mejora de la disfunción mitocondrial que los ratones mutantes sufren desde antes del comienzo de la preneurodegeneración. **Por lo tanto, el tratamiento con rhVEGF-B tiene notables efectos terapéuticos ante la degeneración neuronal de los ratones PCD.**

Teniendo en cuenta estas conclusiones, **podemos confirmar nuestra hipótesis**: el tratamiento con factores neurotróficos, en concreto con VEGF-B, tiene efectos protectores sobre la degeneración cerebelosa asociada a la mutación *pcdy* y debe valorarse como una posible estrategia terapéutica en el abordaje de las enfermedades neurodegenerativas.



ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION

Neurodegenerative diseases are a group of disorders of the central nervous system (CNS) characterized by the progressive loss of neurons in different regions. These diseases represent an increasingly important public health problem due to their prevalence, morbidity and mortality (<https://www.who.int/publications/i/item/9789241563369>). Several recent studies have identified a new neurodegenerative disease of childhood origin with cerebellar atrophy called CONDCA, which affects the Purkinje cells of the cerebellum and causes severe ataxia from a very early age (Shashi *et al.*, 2018; Sheffer *et al.*, 2019; Karakaya *et al.*, 2019; Baltanás *et al.*, 2021). This disease results from the loss of function of the protein CCP1 (also known as AGTPBP1 or NNA1), which acts as a cytosolic carboxypeptidase. More precisely, impairments in this protein cause a destabilization of the cytoskeleton, amongst other cellular symptoms, that finally leads to neuronal death (Berezniuk *et al.*, 2012; Karakaya *et al.*, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). Fortunately, there is an animal model that exhibits a mutation and neurodegenerative process similar to those observed in CONDCA patients, the PCD mutant mouse (Purkinje Cell Degeneration; Mullen *et al.*, 1976; Blanks *et al.*, 1982; Greer and Shepherd, 1982; Fernández-González *et al.*, 2002).

The effect of the *pcd* mutation is the postnatal and selective degeneration of certain neuronal populations in which the *Ccp1* gene is normally highly expressed, such as the Purkinje cells of the cerebellum. The absence of this gene expression due to the mutation provokes the Purkinje cell death, the most striking symptom that gives the model its name (Fernández-González *et al.*, 2002). The neurodegenerative process of Purkinje cells can be divided into two stages: the pre-degenerative stage from postnatal day 15 (P15) to P18, in which nuclear, cytological and morphological changes are detected (Ford *et al.*, 2008; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018), and the degenerative stage *per se*, from P18 onwards, when Purkinje cell death is evident, with only a few Purkinje neurons remaining in lobule X of the cerebellar vermis at P40 (Mullen *et al.*, 1976; Landis and Mullen, 1978; Fernández-González *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2010; Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Zhou *et al.*, 2018). The most representative phenotypic feature of PCD mutant mice is cerebellar ataxia, which occurs from the third week of postnatal life (Landis and Mullen, 1978; Le Marec and Lalonde, 1997; Díaz *et al.*, 2018, Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Moreover, in recent years, additional effects of *pcd* mutation on cognitive and social function have been reported (Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018; Pérez-Martin *et al.*, 2021) as well as changes induced by the inactivity of CCP1 enzyme and related to mitochondrial stability (Gilmore-Hall *et al.*, 2018). In this sense, both morphological and functional mitochondrial abnormalities have been observed, as well as increased mitophagy and decreased respiratory chain complex activities in PCD mice (Chakrabarti *et al.*, 2009).

Considering these features, the PCD mouse has been extensively used to investigate new neuroprotective strategies to prevent –or at least attenuate– neurodegeneration (Recio *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2012b, 2019; Pérez-Martín *et al.*, 2021). The main experimental approaches are aimed at reversing or preventing cerebellar degeneration in these mutant mice and prevent or palliate the aggressive Purkinje cell death. Among the possible neuroprotective substances that can be administered in this model of degeneration, we highlight the administration of neurotrophic factors, a group of secreted molecules that belong to different biochemical families but have in common that they are required for the proper functioning of neurons, stimulating cell signaling and the growth of axons and dendrites (Ledda and Paratcha, 2016). The following is a detailed description of the neurotrophic factors used in this study.

Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1) is a member of the insulin-like peptide superfamily. It is a potent growth factor in the CNS, and it is essential for the development, differentiation, and proliferation of various neuronal types, as well as their functional and structural integration into pre-existing neuronal circuits, mediating changes in the morphology, synaptic efficacy and organization of the developing CNS (Dyer *et al.*, 2016).

Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) is a member of the neurotrophin family. The major functions of BDNF include developmental processes, regulation of neurogenesis, neuroprotection, and control of short- and long-term synaptic interactions that influence mechanisms of memory and cognition (Park and Poo, 2013; Foltran and Diaz, 2016; Gonzalez *et al.*, 2016; Sasi *et al.*, 2017).

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) is the main endothelial cell-specific growth factor. It is a member of the VEGF/PDGF³⁵ superfamily. It is a key molecule in the regulation of endothelial cells: it promotes their proliferation, migration and survival –i.e., angiogenesis– as well as vascular permeability (Ferrara *et al.*, 2004). On the other hand, it has also been implicated in neuroprotection by inducing axonal growth, differentiation and neuronal migration (Oosthuyse *et al.*, 2001; Storkebaum *et al.*, 2004).

Vascular Endothelial Growth Factor B (VEGF-B) is another member of the VEGF/PDGF superfamily. Unlike other members of the VEGF family, this neurotrophic factor lacks general angiogenic activity, and its functions are primarily neuroprotective and metabolic. The neuroprotective effects are due to the fact that it stimulates neurogenesis and inhibits apoptosis (Sun *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008). On the other hand, this neurotrophic factor has been associated with proper mitochondrial function, as it normalizes mitochondrial membrane potential and enhances protective processes during cellular stress (Olsson *et al.*, 2006; Falk *et al.*, 2010; Dhondt *et al.*, 2011).

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

In the present Doctoral Thesis, we will use the PCD mouse as a model of progressive neuronal deterioration affecting motor, cognitive and social behavior. New pharmacological treatments aimed at preventing this dysfunction will be tested on this animal. Therefore, the hypothesis of this Doctoral Thesis is that *the treatment with neurotrophic factors has neuroprotective effects in the PCD model of selective neuronal degeneration*.

To test this hypothesis, the following general and specific objectives have been proposed:

- I. To analyze the expression pattern in the PCD mouse of the most relevant neurotrophic factors in development, growth and cell proliferation, in comparison with control animals.
 - a. To study the gene fluctuations of *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* and *Vegf-B* along the neurodegenerative process of the PCD mouse cerebellum.
 - b. To confirm the relevance of the aforementioned gene expression by examining protein production of the neurotrophic factors of interest.

³⁵ Platelet-Derived Growth Factor

- II. To analyze the neuroprotective effect of rhIGF-1 (human recombinant form of the molecule).
 - a. To administer rhIGF-1 in accordance with its fluctuations along the cerebellar degenerative process in PCD mouse.
 - b. To assess its effect on motor, cognitive and social functions of PCD animals along such neurodegenerative process.
 - c. To study the protective effect of rhIGF-1 on Purkinje cells of the PCD mouse.
- III. To analyze the neuroprotective effect of rhVEGF-B (human recombinant form of the molecule) treatment.
 - a. To administer rhVEGF-B throughout the degenerative process of the cerebellum in the PCD mouse.
 - b. To evaluate the effect of optimal rhVEGF-B treatment on motor, cognitive and social functions in parallel with such neurodegenerative process.
 - c. To study the effect of rhVEGF-B treatment on Purkinje cell survival in PCD mice.
 - d. To evaluate skeletal muscle for possible changes after rhVEGF-B treatment.
 - e. To assess the onset of mitochondrial dysfunction associated with the PCD mutation and to analyze the effect of rhVEGF-B treatment on mitochondrial quality.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

Mice (*Mus musculus* L. 1758, Muridae, Rodentia, Mammalia) were housed in the animal facilities of the University of Salamanca (Salamanca, Spain) under a 12/12 h light/dark cycle, constant room temperature and humidity, and fed *ad libitum* with water and special rodent chow (Envigo, IN, USA). All procedures of this study were performed in compliance with the guidelines established by European (Directive 2010/63/EU) and Spanish (RD118/2021 and Law 32/2007) legislation and were approved by the Bioethics Committee of the University of Salamanca (Reference #613).

Wild-type (WT) and mutant PCD mice on a C57BL/DBA background of different ages and both sexes were used in this study. This hybrid strain was obtained by crossing C57BL/6J and DBA/2J animals from Jackson Laboratories (Bar Harbor, MA, USA). Due to the

reproductive characteristics of animals homozygous for the mutation (*pcd/pcd*), colony maintenance was performed by crosses between heterozygous (*+/pcd*) individuals.

Since WT (*+/+*), heterozygous (*+/pcd*) and mutant (*pcd/pcd*) animals are phenotypically indistinguishable at early ages prior to neurodegeneration, it is necessary to perform genotyping as previously described (Valero *et al.*, 2006; Díaz *et al.*, 2012a, 2019)

This Doctoral Thesis has been organized as follows. First, a search for new substances with therapeutic effect has been carried out, for which we have analyzed the expression of several neurotrophic factors in the cerebellum of WT and PCD mice. These analyses allowed us to create an experimental design in which we administered the recombinant proteins of the altered neurotrophic factors, which were IGF-1 and VEGF-B.

Therefore, the following objectives were included to analyze the effect of treatment with rhIGF-1 and rhVEGF-B in PCD mice. The improvement observed only after treatment with rhVEGF-B led us to analyze the structure of skeletal muscle, and mitochondrial quality – studying both the effect of the *pcd* mutation and its possible recovery after treatment with rhVEGF-B.

Molecular analyses

Animals were sacrificed by cervical dislocation and decapitation. The cerebellum was sectioned along the sagittal midline to obtain the two cerebellar hemispheres with their corresponding vermis separately. The left hemisphere was used for gene analysis by qPCR, while the right hemisphere was used for protein analysis by ELISA.

For gene analyses, RNA was isolated from the left hemicerebellum using the PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, MA, USA) and the PureLink™ DNase Set (Invitrogen). 1000 ng of RNA were converted to cDNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied biosystems, CA, USA). qPCR was performed using PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) and the specific pairs of primers for the neurotrophic factors analyzed: *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A*, and *Vegf-B*.

For protein analysis, the right hemicerebelli of the same mice used for gene analysis by qPCR were processed. We isolated and quantified total protein, and then performed the specific ELISA analyses using IGF-1 (MG100, R&D Systems, MN, USA), BDNF (EM0020, FineTest, China), VEGF-A (MMV00, R&D Systems), and VEGF-B (SEA144Mu, USCN, China) kits.

Pharmacological therapy

Both rhIGF-1 (Cat: 100-11, Peprotech, NJ, USA) and rhVEGF-B (Cat: 100-20B, Peprotech) were freshly prepared to avoid degradation of the compounds. Each drug was diluted in NaCl 0.9% (w/v) to the concentration of use, which was 25 µg/ml for rhIGF-1 and 1.5 µg/ml for rhVEGF-B. Both substances were administered intraperitoneally in a volume of 10 µl/g animal weight. For rhIGF-1 treatment, administration was daily from P20 to P30, while for rhVEGF-B we used two administration schedules from P10 to P20: one every other day and the other daily (Fig. 1). In addition, one group of animals was treated with 0.9% (w/v) NaCl only to exclude possible effects due to administration procedures (Fig. 1). All treated animals were dosed in the morning between 9 and 12 AM and their body weight was monitored throughout the experimental procedures.

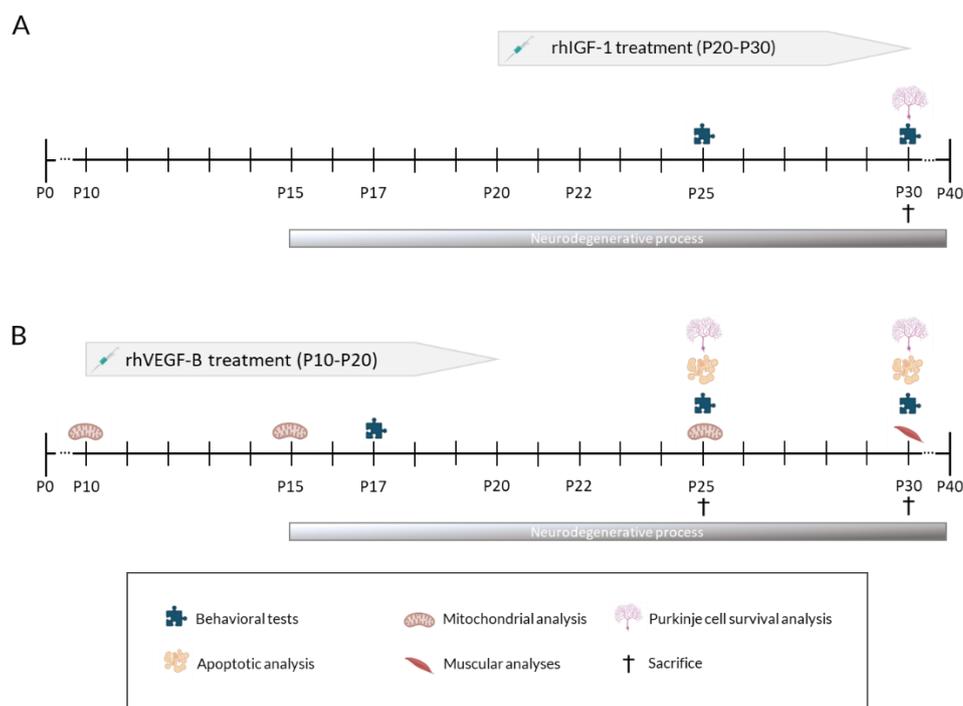


Figure 2. Experimental design of the different treatments evaluated in this Doctoral Thesis and the main analyses carried out.

Behavioral analyses

A battery of behavioral tests related to motor, cognitive and social functions were performed at different time points throughout the degenerative process of PCD mice. The ages depended on the study performed (indicated in each section).

The *Novel Object Recognition* (NOR) test was performed to evaluate recognition memory in rodents (Ennaceur and Delacour, 1988; Ennaceur, 2010; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). On the first day of testing, two identical objects were placed in opposite corners of the cage and presented to each animal for 10 min (the familiar object). Then, one of the familiar objects was replaced with a novel object, and the test began. We analyzed the percentage of time spent exploring the familiar and the novel object. Healthy WT mice tend to spend more time exploring novel than familiar objects.

The *three-chamber social preference* test was performed to analyze social behavior in a white Plexiglas box divided into three connected rooms (Moy *et al.*, 2004; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). After the habituation process, the analyzed mouse was placed in the central room, while the adjacent rooms contained either a mouse or an object, both covered with a container that allows social and olfactory interaction, but not direct physical interaction.

The percentage of time spent interacting with the animal or the object was calculated. In this case, healthy WT mice tend to spend more time with another animal than with an unanimated object.

The *Rotarod* test (LE8200, Panlab, Barcelona, Spain) was used to analyze motor coordination, as previously described (Schönfeld *et al.*, 2017; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018). This test consists of a rod rotating at a speed of 0.06 rpm/s, with accelerations ranging from 4 to 40 rpm. Latency to fall was analyzed as an average of 7 trials with 20 min rest between trials for each mouse and day of testing.

Histological and cytological analyses

Tissue extraction and processing

Animals were anesthetized with 10 μ l/g (body weight) chloral hydrate (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) and perfused intracardially with 0.9% NaCl (w/v) and 100 μ l of 1000 U/ml heparin, followed by modified Somogyi's fixative, except for mitochondrial analysis, where we used only 4% paraformaldehyde (w/v) in phosphate buffer (PB). The cerebellum and muscle were extracted and washed with PB and cryoprotected with 30% sucrose (w/v)

in PB. The cerebellum was sectioned using a freezing-sliding microtome (Jung SM 2000, Leica Instruments, Wetzlar, Germany) and were stored in cryoprotective solution at -20 °C. Muscle was sectioned using a Microm HM 560 cryostat (Thermo Scientific, MA, USA) to obtain 8 µm thick sections oriented longitudinally and transversely to the major axis of the muscle and they were stored at -20 until they were used for immunostaining.

For immunofluorescence analyses, four equidistant parasagittal sections of the cerebellar vermis were incubated with the primary and secondary antisera containing the antibodies listed in Table 1.

	Antibody	Species	Dilution	Company
Primary antibody	Calbindin D28k	Guinea pig	1:500	Synaptic Systems
	PDH E1 subunit α	Mouse	1:150	Abcam
	PCx	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich
	SHMT2	Rabbit	1:200	Sigma-Aldrich
	MTCO1	Mouse	1:200	Sigma-Aldrich
Secondary antibody	Alexa 488	Mouse	1:500	Abcam
	Alexa 488	Rabbit	1:500	Abcam
	Alexa 546	Rabbit	1:500	Abcam
	Alexa 594	Rabbit	1:500	Abcam
	Alexa 647	Guinea pig	1:500	Synaptic systems

Table 1. List of primary and secondary antibodies used in the indirect immunofluorescence technique.

For the TUNEL technique, we labeled the free 3'OH ends generated after DNA breaks using terminal transferase (2 µl/ml; Roche, Basel, Switzerland), which adds biotinylated dUTP nucleotides (1 µl/ml; Roche), which are finally detected with Cy3-conjugated streptavidin (1:200; Jackson ImmunoResearch Laboratories).

For skeletal muscle analysis, we use hematoxylin and eosin staining, which was carried out by hydration, followed by hematoxylin and eosin stainings (Panreac, Castellar del Vallès, Spain), and a final dehydration.

Microscopy visualization and quantifications

Processed cerebellar vermis sections were visualized using an Olympus Provis AX70 epifluorescence microscope equipped with an Olympus DP70 digital camera (12.5 MP, Olympus, Tokyo, Japan) and Neurolucida software (MBF Bioscience, Williston, VT, US). In general, all cell counts were performed considering the entire cerebellar vermis (lobes I to

X). Image analysis of mitochondrial markers and skeletal muscle were performed using ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA).

Statistical analyses

Considering the size of the samples, in this Doctoral Thesis we have generally performed non-parametric tests, using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis U tests, depending on the number of experimental groups. However, for the statistical analysis of the *Rotarod* test, the one-way repeated measures ANOVA test was used to determine the interaction between the variables analyzed, since learning may influence on the performance through the test.

In all cases, the minimum level of statistical significance was set at $p < 0.05$. All statistical analyses were performed with the statistical program SPSS version 28 for Windows (IBM, NY, USA).

RESULTS AND DISCUSSION

Changes in gene and protein expression of neurotrophic factors

In order to search for new substances with therapeutic potential in our model, we analyzed the gene expression of *Igf-1*, *Bdnf*, *Vegf-A* and *Vegf-B* in the cerebellum of WT and PCD mice throughout the neurodegenerative process of the PCD mutant mouse: P10 (before any reported damage), P15 (pre-neurodegeneration), P20 (start of Purkinje cell loss), P25 (ongoing neuronal death), P30 (end of neuronal death), and P40 (after cerebellar degeneration). In addition, we studied the production of the corresponding proteins in both cerebellar tissue and blood plasma at the key ages of the neurodegenerative process, P15 and P25 (pre-neurodegeneration and ongoing degeneration, respectively), and at those when we observed changes at the gene level. As a result, these analyses showed differences in two of the factors analyzed, IGF-1 and VEGF-B (Fig. 2).

In the case of IGF-1, we observed changes at P25 and P40 in PCD compared to WT mice. At P25 we saw increased gene expression (Fig. 2 A; $p = 0.010$) corresponding to increased protein production in the cerebellum of PCD mice (Fig. 2 B; $p = 0.029$), but not in blood plasma, where we observed a reduction of IGF-1 (Fig. 2 C; $p > 0.05$). First, it should be noted that this neurotrophic factor is produced in all cell types of the CNS (Bach *et al.*, 1991; Bondy and Lee, 1993). Despite this, IGF-1 mRNA expression in the brain is relatively low, so its production at the peripheral level is crucial (Fernández and Torres-Aleman, 2012),

representing more than 70% of the total production (Botusan *et al.*, 2018). We should remember that at P25 a very rapid and aggressive Purkinje cell death occurs (Mullen *et al.*, 1976; Baltanás *et al.*, 2011a) and that IGF-1 has neuroprotective effects (McMorris *et al.*, 1993; Yao *et al.*, 1995; Chesik *et al.*, 2008). Thus, a hypothesis would be that peripheral IGF-1 travels to the brain to supply these needs.

Conversely, at P40 we see the opposite situation: despite increased gene expression in the cerebellum (Fig. 2 A; $p = 0.016$), the protein level of IGF-1 remained similar to WT mice in this area (Fig. 2 B; $p > 0.05$), while it increased in the blood plasma (Fig. 1 C; $p = 0.016$). Since Purkinje cell degeneration can be considered complete at P40 (Mullen *et al.*, 1976), this demand for IGF-1 seems to be due to other pathophysiological situations that are probably occurring outside the cerebellum, and thus the plasma levels of IGF-1 raised, because of a new body redistribution of this substance.

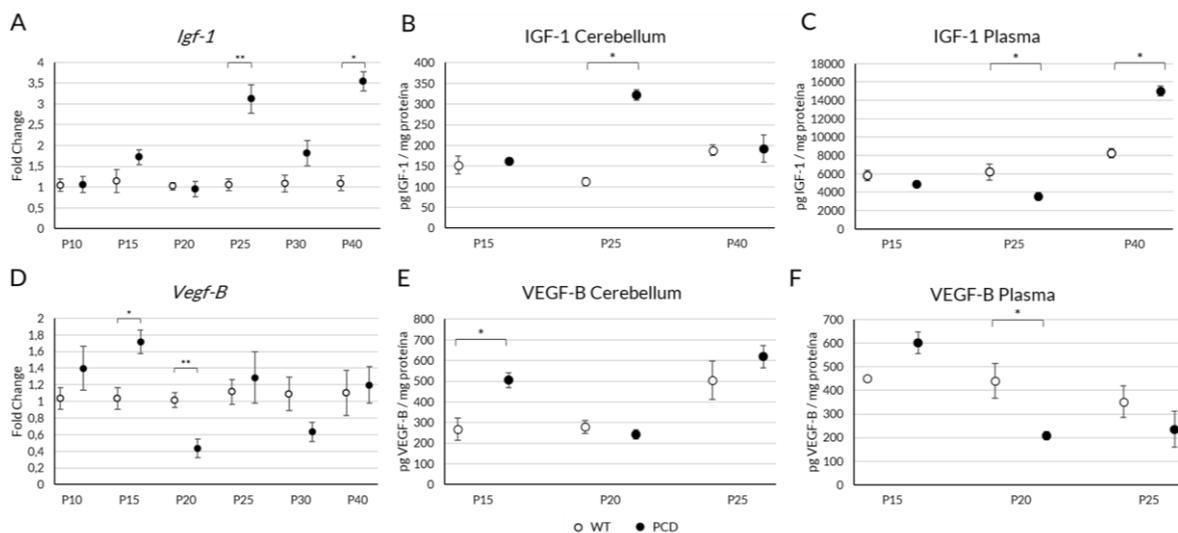


Figure 2. Analyses of gene and protein expression of IGF-1 and VEGF-B in WT and PCD mice. (A-C) Graphical representation of gene (A), and protein expression in cerebellum (B) and in blood plasma (C) of IGF-1. (D-F) Analysis of gene (D), and protein expression in cerebellum (E) and blood plasma (F) of VEGF-B. Note that at P25 there is an increase in both *Igf-1* and IGF-1 in the cerebellum of PCD mice; however, the protein levels decrease in the blood plasma. At P40, there is an increase in gene but not in protein expression of IGF-1 in the cerebellum; an additional protein increase in blood plasma is also evident. For VEGF-B, we observed an increase in both gene and protein expression in the cerebellum at P15. Conversely, at P20, there is a decrease in gene expression in the cerebellum, accompanied by a reduction of protein levels in blood plasma in mutant mice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

For VEGF-B, we found fluctuations at P15 and P20. At P15, gene expression increased in PCD mice (Fig. 2 D; $p = 0.016$), which also corresponded to an increase in protein production in the cerebellum (Fig. 2 E; $p = 0.042$). However, at this age no changes were seen in protein expression in the blood plasma (Fig. 2 F; $p > 0.05$). Contrary to IGF-1, the variations in VEGF-B seem to be circumscribed to a local environment. The increase in VEGF-B at P15 may be related to the onset of cerebellar pre-degeneration in the PCD

mouse –estimated at P15 (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019)– as it has been shown that after neuronal damage there is an increase in VEGF-B, which plays an important role in the cellular repair process (Nag *et al.*, 2002).

Moreover, VEGF-B is closely related to mitochondrial quality (Olsson *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Dhondt *et al.*, 2011), and several studies show that *pcd* mutation leads to dysfunction of these organelles (Chakrabarti *et al.*, 2009; Gilmore-Hall *et al.*, 2018). On the other hand, at P20 –the time when Purkinje cell death begins– we found a reduction in gene expression in the cerebellum (Fig. 2 D; $p = 0.004$) and in protein levels in the blood plasma in mutant mice (Fig. 2 F; $p = 0.042$), with no changes in protein production in the cerebellar tissue (Fig. 2 E; $p > 0.05$). Another function of VEGF-B is its effect on apoptotic processes, which promotes cell survival, as it induces the expression of anti-apoptotic genes and inhibits the pro-apoptotic ones (Li *et al.*, 2008; LeBlanc *et al.*, 2018). Interestingly, some anti-apoptotic proteins, such as Bcl-2 in, decrease in PCD mice at P22 (Gillardon *et al.*, 1995). In this sense, VEGF-B could create an anti-apoptotic and neuroprotective environment while its expression is upregulated, which would explain the increase in programmed cell death after the decrease in its expression.

Thus, each altered neurotrophic factor seems to be associated with a stage of the degenerative process. First, we found changes in VEGF-B corresponding to early stages of neurodegeneration: P15 –when pre-neurodegeneration begins– and P20 –when neuronal death begins–. Then, IGF-1 increases its expression in later stages: P25 –when neuronal death is complete– and P40 –the end of the cerebellar degenerative process–.

The expression pattern of these two neurotrophic factors was useful for us to create an experimental design according to which we treated PCD mice with the recombinant human forms of both proteins, rhIGF-1 and rhVEGF-B. For both treatments, we used a *sham* group of NaCl-treated PCD animals to test the effect of continuous injections, since their repetition may cause severe stress due to immobilization, cumulative irritant effects, or needle damage (Morton *et al.*, 2001).

rhIGF-1 treatment

Treatment with rhIGF-1 was performed daily from P20 to P30, and its effect on body weight, motor, cognitive and social behavior, and Purkinje cell survival was evaluated.

Effect of Treatment on body weight

Throughout the rhIGF-1 treatment, the body weight of mice in all experimental groups was monitored. After this measurement, we observed a lower body weight of mutant mice compared to WT mice (data not shown), as previously described (Mullen *et al.*, 1976). However, we found a recovery of body weight in rhIGF-1 treated mice, reaching similar values to those of WT mice (data not shown).

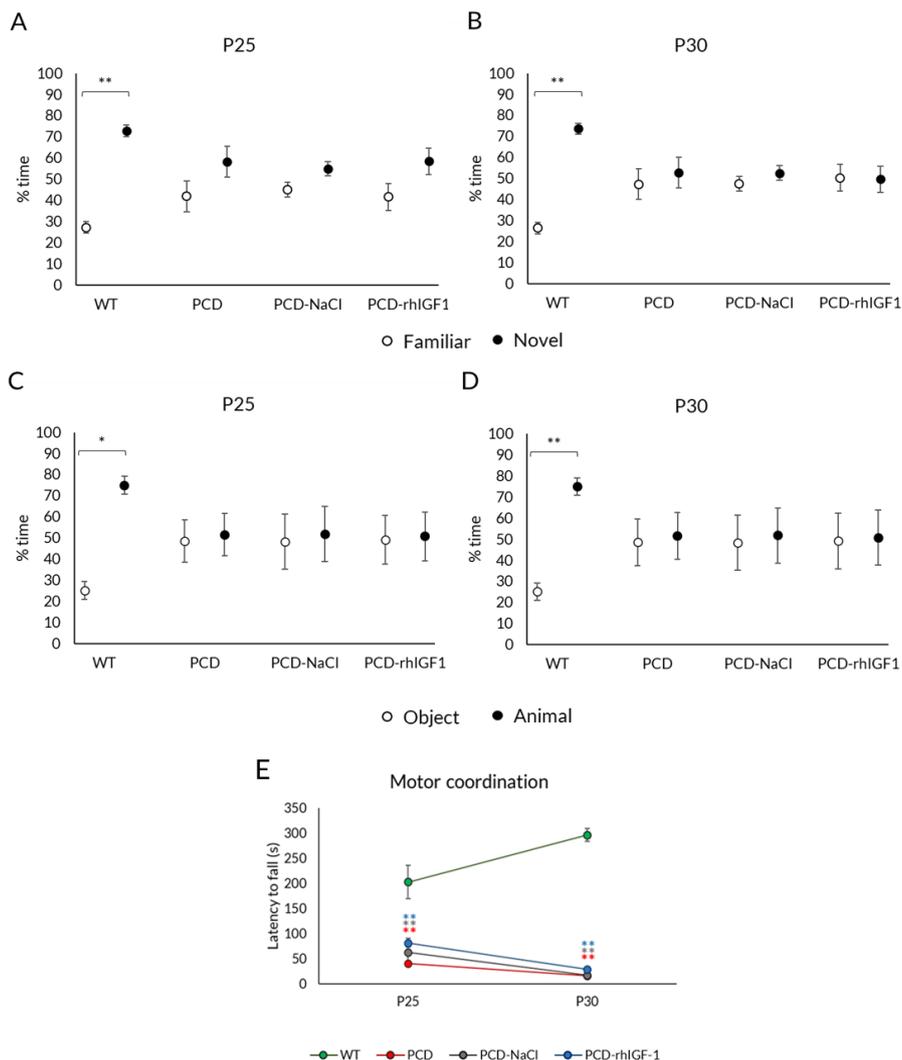
This result is supported by several studies in which IGF-1 treatment led to an increase in body weight (Carrascosa *et al.*, 2004; Castro *et al.*, 2014). This is due to the fact that IGF-1 is a potent growth factor that stimulates body development and has growth-promoting effects on almost all cells in the body (Laron, 2001; Yakar and Adamo, 2012).

Effect of treatment on behavior and neuronal survival

We analyzed the effect of rhIGF-1 treatment on motor, cognitive and social behavior at P25 and P30 (Fig. 3). We did not find any improvement in any of the tests performed (Fig. 3). In all these tests (recognition memory, social behavior and motor coordination), rhIGF-1-treated PCD mice behaved similarly to untreated PCD mice.

Figure 3. Effect of rhIGF-1 treatment on behavior throughout the neurodegenerative process in PCD mice. (A-B) Analysis of recognition memory: quantification of the percentage of time spent exploring the familiar and novel object at P25 (A) and P30 (B) of WT, PCD, PCD-NaCl and PCD-rhIGF1 mice. **(C-D) Analysis of social behavior:** quantification of the percentage of time spent exploring the animal or object at P25 (C) and P30 (D) of WT, PCD, PCD-NaCl and PCD-rhVEGFB mice. **(E) Analysis of motor behavior** at P25 and P30 of the above experimental groups. As it can be seen, rhIGF-1 treatment does not restore the altered functions in PCD mice. Moreover, continuous treatment does not induce behavioral changes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

After sacrificing the animals at P30, we analyzed Purkinje cell survival (Fig. 4). Again, we did not find differences between rhIGF-1-treated mutant mice and untreated PCD animals (Fig. 4 E; $p > 0.05$), confirming that the rhIGF-1 treatment does not exert a neuroprotective effect on cerebellar degeneration in PCD mice and therefore does not restore altered cerebellar functions. On the other hand, the absence of differences in sham mice ($p > 0.05$) allowed us to exclude the influence of stress in all these results, as it has been described in other cases (Ryabinin *et al.*, 1999; Du Preez *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2022). Looking at the existing literature, our data are quite surprising, as several studies have shown an improvement in motor function after IGF-1 treatment in animal models whose ataxia is caused by different etiologies (Hantai *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1996; Contreras *et al.*, 1997; Saatman *et al.*, 1997; Fernandez *et al.*, 1998, 1999; Markowska *et al.*, 1998; Carro *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2022). However, there is one study that supports our findings: in 2003, Nahm *et al.* showed that exogenous administration of IGF-1 neither prevented nor rescued Purkinje cell death in their model of cerebellar neurodegeneration associated with calcium channel mutations (Nahm *et al.*, 2003). Indeed, this last work suggests that



IGF-1 treatment is more effective when started at pre-neurodegenerative stages, also exerting a protective rather than a neuronal rescue effect. Since rhIGF-1 administration in our work lasted from P20 to P30, Purkinje cell death in PCD mice was already started and, therefore, the treatment may result ineffective.

In conclusion, although there is some evidence that IGF-1 has a neuroprotective effect on cerebellar degeneration, our data did not show significant improvements. Therefore, we did not perform further analyses with this neurotrophic factor.

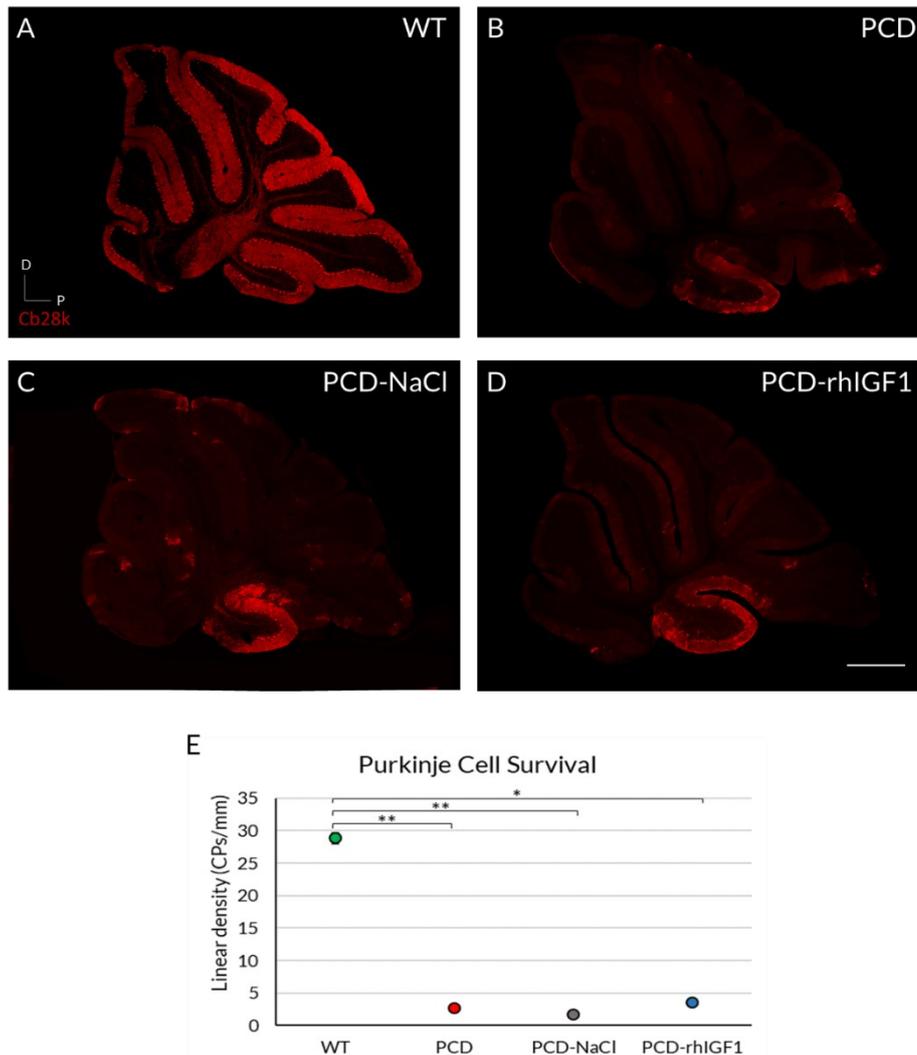


Figure 4. Effect of rhIGF-1 treatment at the histological level at P30. (A-D) Calbindin (Cb28k, in red) immunofluorescence of sagittal sections of the cerebellar vermis of WT (A), PCD (B), PCD-NaCl (C) and PCD-rhIGF1 (D) mice. (E) Graphical representation of Purkinje cell survival in the whole cerebellum of WT, PCD, PCD-NaCl, and PCD-rhVEGF-B mice at P30. As it can be seen in the images, mutant animals show a significant decrease in the number of Purkinje cells compared to WT, with the exception of lobe X. Quantitative analysis revealed differences between the PCD (treated and untreated) and WT mice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Scale bar 500 μm .

rhVEGF-B treatment

rhVEGF-B was administered every second day from P10 to P20. In addition, after the positive results obtained with this dosing schedule, we decided to try another one in which we administered rhVEGF-B daily at the same ages described above. After behavioral and cell survival analyses, we found that the optimal dosing schedule was the first one, as daily dosing had a detrimental effect on Purkinje cells (data not shown). Finally, based on the optimal schedule, we went a step further in studying the basis of the neuroprotection exerted by rhVEGF-B by analyzing the structure of skeletal muscle and the effect of the *pcd* mutation on mitochondrial quality and whether there was a recovery of these organelles after treatment with rhVEGF-B.

Effect of rhVEGF-B on body weight

Similar to the previous treatment, we monitored the body weight of the experimental groups used. As noted previously, we found a significant reduction in body weight in PCD mice compared to WT mice (Mullen *et al.*, 1976). On the other hand, we found no differences in weight between standard PCD mice and those treated with rhVEGF-B, either continuously or every other day (data not shown), so we can conclude that rhVEGF-B treatment has no effect on body weight. The lack of effect is because VEGF-B does not exert a direct effect on tissue growth, but rather on neuroprotection (Sun *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008) and regulation of mitochondrial quality (Falk *et al.*, 2010; Yue *et al.*, 2014).

Effect of treatment on motor, cognitive and social behavior

To evaluate the neuroprotective effect of rhVEGF-B treatment every second day, we performed the study of motor, cognitive and social abilities at P17, P25 and P30. rhVEGF-B administration caused an improvement in all the functions analyzed. First, at P17, we found a complete recovery of motor capacity, measured by the *Rotarod* test, where we found no significant differences compared to WT mice ($p < 0.05$), but we did find them after testing the untreated PCD group (Fig. 5 G; $p < 0.001$). From P25 onwards, we saw a worsening of motor performance of PCD-rhVEGFB mice, so we started to find differences with WT animals (Fig. 5 G; $p_{P25} = 0.016$; $p_{P30} = 0.001$, *p value* PCD-VEGFB vs. WT mice). Nevertheless, PCD-rhVEGFB animals performed *Rotarod* tests better than untreated mutant mice at P25 and P30 (Fig. 5 G), and we found significant differences ($p_{P25} = 0.023$; $p_{P30} = 0.002$ *p value*) with respect to PCD mice. Furthermore, after rhVEGF-B treatment, we found a complete recovery of the recognition memory, since PCD-treated mice spent most of the time exploring the new object at all analyzed ages ($p_{P17} = 0.000$; $p_{P25} = 0.005$; $p_{P30} = 0.001$), similar to what was observed in WT mice (Fig. 5 A-C).

The same positive effect was detected in terms of social behavior, since the percentage of time spent exploring the animal was higher than that spent exploring the object at all ages analyzed (p P17 < 0.001; p P25 = 0.001; p P30 = 0.003) in both WT and treated-PCD animals (Fig. 5 D-F). On the other hand, we did not observe any differences between PCD and PCD-NaCl mice (p > 0.05), so this type of continuous administration did not seem to affect the behavior of mice (Fig. 5).

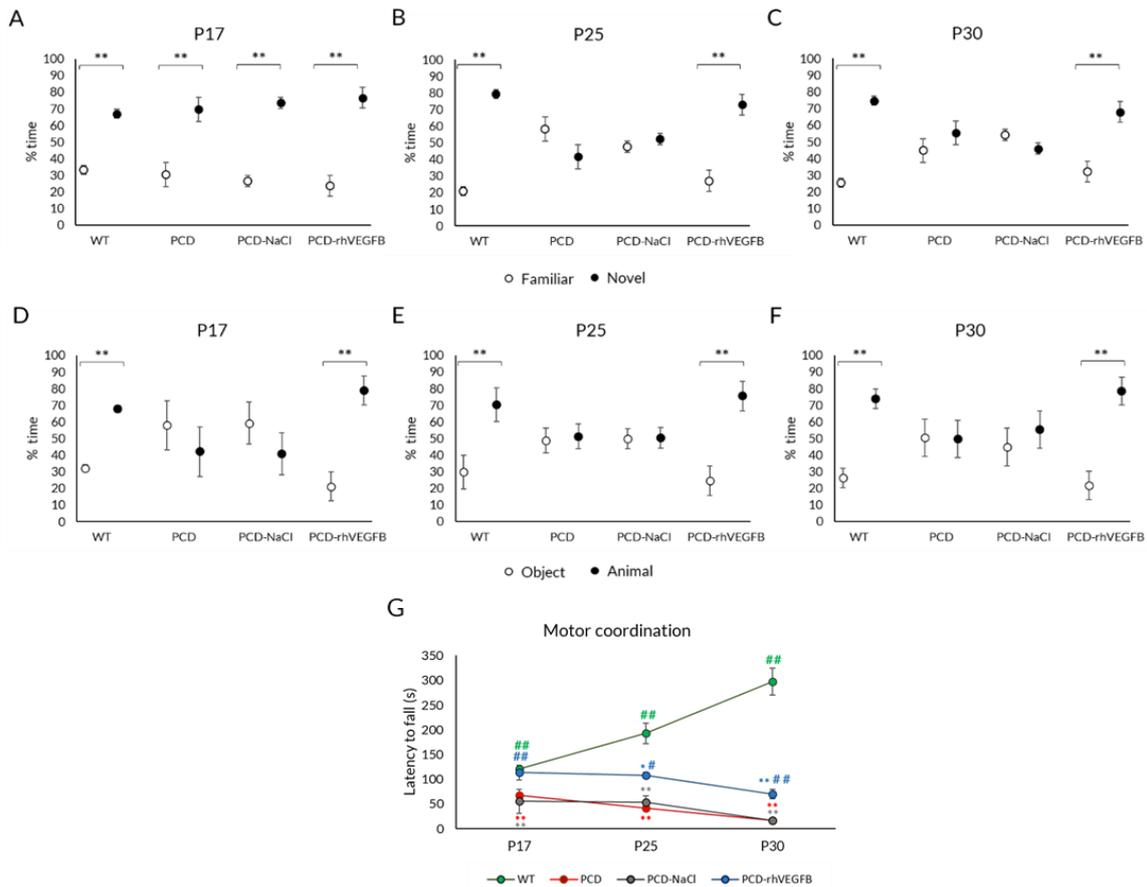


Figure 5. Effect of rhVEGF-B treatment on behavior throughout the degenerative process in PCD mice. (A-C) Analysis of recognition memory: Quantification of the percentage of time spent exploring the familiar and the novel object at P17 (A), P25 (B) and P30 (C) of WT, PCD, PCD-NaCl and PCD-rhVEGF-B mice. **(D-F) Analysis of social behavior:** (E-G) Quantification of the percentage of time spent exploring the animal or the object at P17 (D), P25 (E) and P30 (F) in the same experimental groups as above. **(G) Analysis of motor behavior** at P17, P25 and P30 of the same experimental groups mentioned above. As it can be seen, treatment with rhVEGF-B completely restores recognition memory and social behavior, and partially improves motor behavior. * p < 0.05; ** p < 0.01, differences between PCD and WT groups; # p < 0.05; ## p < 0.01 for differences between PCD-NaCl and PCD-rhVEGF-B experimental groups and PCD mice.

These results are comparable to those observed in animal models of Parkinson's disease, where preventive treatment with rhVEGF-B improved motor behavior (Falk *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2013).

Our data demonstrate for the first time the neuroprotective effect of rhVEGF-B treatment at the same time on motor, cognitive and social behavior, as there are no previous studies showing this neuroprotective effect in models of cerebellar ataxia or other cognitive-affective alterations.

Effect of treatment at the histologic level

To test the effect of treatment with rhVEGF-B administered every second day on Purkinje cell viability, we performed an analysis of the density of those neurons and apoptotic cells at P30. In view of the results obtained, we decided to repeat it five days earlier, at P25, to better understand the details of the improvement observed, as well as its temporal extension. In any case, to facilitate the discussion of these data, we will describe them chronologically.

The analysis of Purkinje cell survival after rhVEGF-B treatment (Fig. 6) showed a similar neuronal density to WT mice at P25 (Fig. 7 A; $p > 0.05$). On the other hand, untreated PCD mice showed a significant reduction in cell density, with differences compared to WT mice ($p = 0.002$) and PCD-rhVEGFB (Fig. 7 A; $p = 0.035$). However, at P30, although we found a significant increase in Purkinje cell density in treated mice compared to PCD mutants ($p = 0.009$), this value was significantly lower than the corresponding of WT mice (Fig. 7 B; $p = 0.008$). Finally, we did not observe any differences between PCD and PCD-NaCl mice ($p > 0.05$), so any effect due to the repeated manipulation of the animals was not evident.

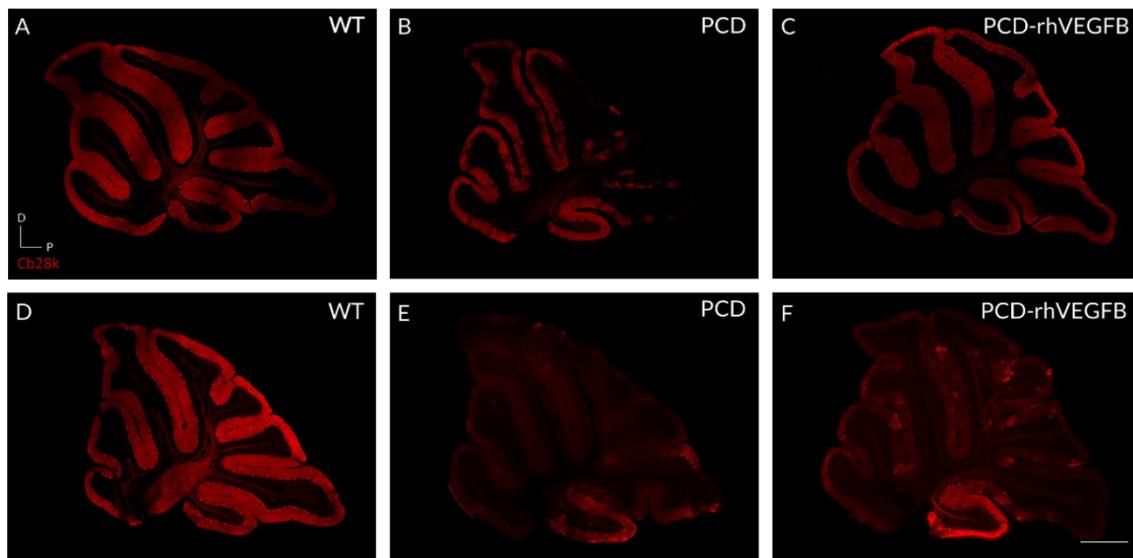


Figure 6. Effect of rhVEGF-B treatment at the histologic level. (A-C) Calbindin immunofluorescence (Cb28k, in red) of sagittal sections of cerebellar vermis from WT (A), PCD (B), and PCD-rhVEGFB (C) mice at P25. **(D-F)** Calbindin immunofluorescence (Cb28k, in red) of sagittal sections of the cerebellar vermis from the same experimental groups as above at P30. Note the higher number of neurons in PCD-rhVEGFB mice compared to the other PCD groups. In addition, the cell density of treated mice at P25 is qualitatively like that of WT mice. Scale bar equals 500 μ m.

Thus, the initial protection exerted by rhVEGF-B was not maintained indefinitely over time. These data are consistent with what has been observed in several studies demonstrating the neuroprotective effect of VEGF-B in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis, where an increase in neuronal density was associated with behavioral improvement (Poesen *et al.*, 2008; Falk *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014). Regarding the temporal extent of the effects of rhVEGF-B, our data suggest that the neuroprotection exerted occurs during treatment. These effects seem to be somewhat more prolonged, because at P25, despite the end of treatment, we still found an apparent neuroprotective effect. On the contrary, at P30 –ten days after the end of the administration–, due to the rapid and aggressive degeneration associated with the *pcd* mutation (Mullen *et al.*, 1976; Wang and Morgan, 2007; Baltanás *et al.*, 2011a), Purkinje cell death was again evident, although in an attenuated or delayed manner. On the other hand, we know that the protective effects of VEGF-B are preventive. Studies in animal models of Parkinson's disease showed that administration of VEGF-B prior to the onset of damage led to an improvement in cell density and behavior. However, this did not occur when treatment began after the onset of degeneration (Yue *et al.*, 2014).

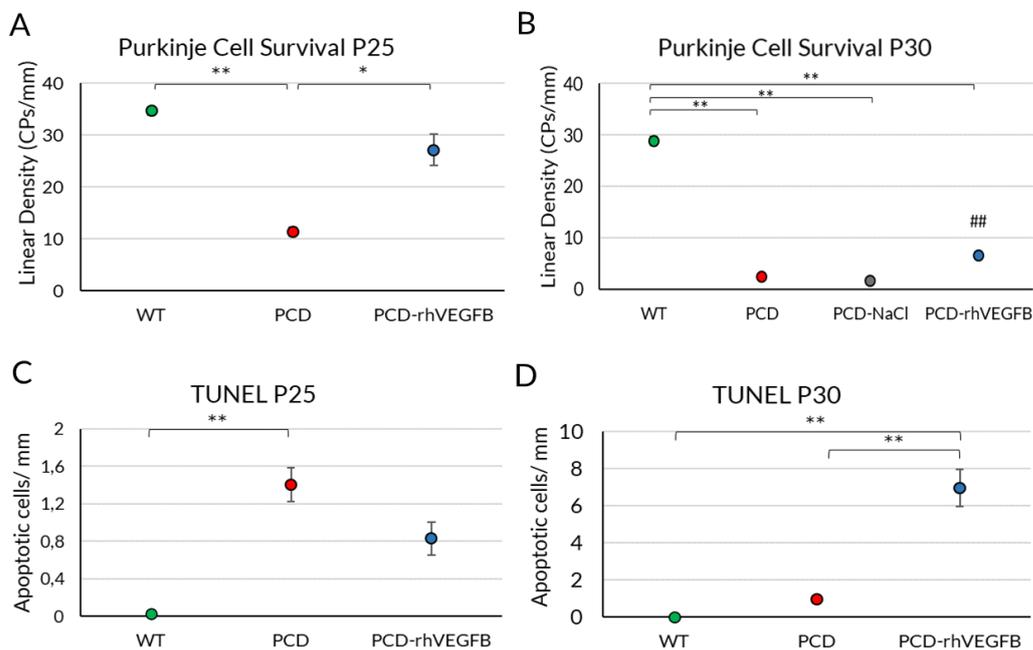


Figure 7. Effect of VEGF-B treatment on Purkinje cell density and apoptosis. (A, B) Quantification of cell survival at P25 (A) and P30 (B) in WT, PCD, and PCD-rhVEGFB mice. Note that at P25 the density of Purkinje cells in treated mice is similar to the WT mice one, whereas at P30 the density of treated mutants decreases significantly, although it is still higher than in untreated PCD mice. At this same age (P30), no differences were detected between untreated PCD and PCD-NaCl mice; thus, we can exclude the effects of continuous administration on cell density. **(C, D)** Graphical representation of the density of apoptotic cells in the cerebellum at P25 (C) and P30 (D) in the same detailed experimental groups. Note that PCD-rhVEGFB mice show an increase in apoptotic cells at both P25 and P30, being higher at the latter age than in untreated WT and PCD mice. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

After these experiments and given the relationship between VEGF-B and the suppression of cell death, we decided to perform an apoptosis study in the Purkinje cell layer. In this regard, we found a significant increase in the density of apoptotic cells at P25 only in PCD compared to WT mice ($p < 0.001$), while the values of PCD-rhVEGFB animals appeared intermediate between the WT and PCD groups (Fig. 7 C; $p > 0.05$ for both experimental groups). In contrast, at P30, we saw that apoptotic cells were significantly increased in PCD-rhVEGFB, reaching higher levels than those found in WT and untreated PCD mice (Fig. 7 D; $p < 0.001$). Therefore, these data suggest that the neuroprotective effect of VEGF-B is due to a partial inhibition or delay of apoptosis (Li *et al.*, 2008), at least until P25. This may occur for several reasons. First, like what was explained above, we may be dealing with a remaining neuroprotective effect of the treatment since it ends at P20. On the other hand, the increase in apoptosis observed at P30 in treated mice may be due to their higher Purkinje cell density compared to standard mutant animals. Thus, since cell death is delayed in treated mice, there is a higher density of Purkinje cells susceptible to DNA damage and to continue their degeneration process, which translates into increased apoptosis labeling by the TUNEL technique.

In conclusion, rhVEGF-B administration delays Purkinje cell death, leading to a partial improvement in motor coordination and overall improvement in cognitive and social functions, although these effects appear to diminish as neurodegeneration progresses.

Treatment with rhVEGF-B does not lead to improvements in skeletal muscle

Cerebellar ataxias are not only associated with problematic primary neuronal damage, but also cause secondary muscle atrophy (Milne *et al.*, 2016). Therefore, the functional improvement of treated mice could be found not only in the attenuation of Purkinje cell death, but also outside the encephalon, as we have observed in previous studies from our laboratory (Díaz *et al.*, 2018). Consequently, we analyzed skeletal muscle from WT, PCD, and PCD-rhVEGFB mice at P30. In this regard, we did not find any differences between the WT and PCD groups, nor did we find any histological variation when we analyzed muscle fibers from rhVEGF-B treated vs. untreated animals (data not shown). These differences with the aforementioned studies may be due to the fact that the alteration of muscle fibers in PCD mice was detected at a much older age than those analyzed in the present study (Carrascosa *et al.*, 2004; Díaz *et al.*, 2018). Therefore, the behavioral improvement of mutant mice after treatment seems to be almost exclusively due to increased neuronal survival in the cerebellum.

Effect of the *pcd* mutation on mitochondrial quality

Previous studies have demonstrated mitochondrial changes in PCD mice during their degenerative process, comprising both morphological alterations (Chakrabarti *et al.*, 2010) and a decrease in complex respiratory chain activities (Chakrabarti *et al.*, 2009). However, it is currently unknown when this onset of mitochondrial dysfunction occurs.

To conduct this study, we analyzed several markers of mitochondrial quality at P10 (before the onset of neurodegeneration, when no degenerative signs are reported), P15 (when pre-neurodegeneration begins), and P25 (when degeneration is overt; Mullen *et al.*, 1976). The markers used were MTCO1, PCx, and SHMT2. MTCO1 is the subunit I of the enzyme cytochrome c oxidase, one of the three subunits of complex IV encoded by mitochondrial DNA. Therefore, by analyzing MTCO1 expression, we study the capacity of oxidative phosphorylation of mitochondria (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17708>). A failure of this process leads to a redox imbalance and an increase in reactive oxygen species (Motori *et al.*, 2020). PCx is an enzyme that catalyzes the conversion of pyruvate to oxaloacetate (Utter *et al.*, 1963). It is a key anaplerotic enzyme because it is involved in maintaining adequate concentrations of the various components of the Krebs cycle (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5091>). Finally, SHMT2 is an enzyme that catalyzes the reversible reaction of serine and tetrahydrofolate to glycine, so it is primarily responsible for glycine synthesis (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6472>). Both PCx and SHMT2 are key players in the response to mitochondrial stress, so changes in their expression give us information about the status of these organelles (Suomalainen *et al.*, 2017; Kiese *et al.*, 2021). This analysis was performed using an image tool called integrated density (ImageJ), which analyzes the intensity of each labeling and its occupied area, also relativized to the area of the neuronal soma.

Starting at P10 (Fig. 8 A-C), we found a reduction in oxidative phosphorylation –measured by MTCO1 levels (Fig. 8 A)– and an increase in mitochondrial stress response proteins –staining levels of PCx (Fig. 8 B) and SHMT2 (Fig. 8 C)– in PCD mice ($p = 0.029$, for all markers). Thus, we observed an altered expression of all markers of mitochondrial dysfunction before the neuronal degeneration. We should recall that the onset of pre-degeneration is estimated at P15, when cytological and nuclear changes are observed in Purkinje cells without detectable cell death (Baltanás *et al.*, 2011a, 2011b, 2019; Muñoz-Castañeda *et al.*, 2018).

Surprisingly, our data indicate that mitochondrial alterations are already present from P10, i.e., 5 days earlier. In this sense, the marked dysfunction of oxidative phosphorylation that we found before the onset of neurodegeneration may be an additional explanation for the rapid neuronal dysfunction of PCD mice (Motori *et al.*, 2020).

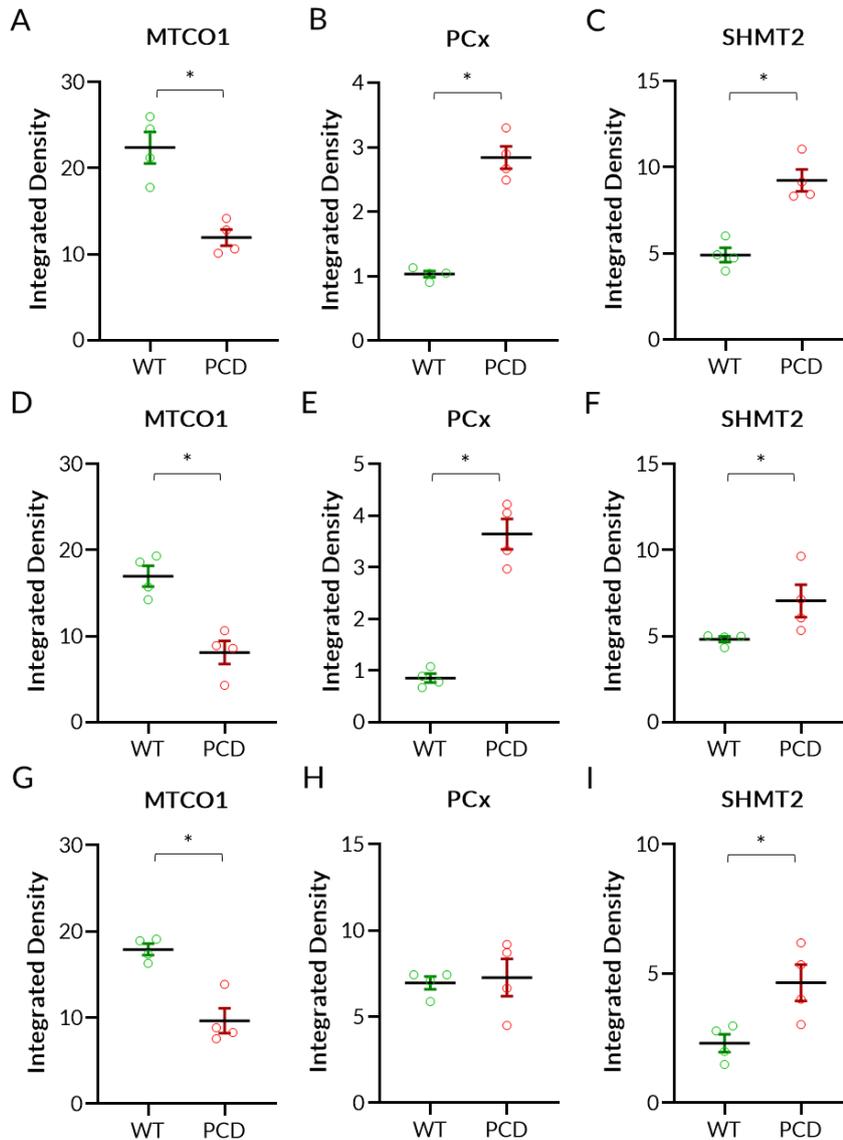


Figure 8. Effect of the *pcd* mutation on mitochondrial quality throughout the neurodegenerative process. Analysis of MTCO1 (A, D, G), PCx (B, E, H) and SHMT2 (C, F, I) at P10 (A-C), P15 (D-F) and P25 (G-I) in WT and PCD mice. As it can be seen, a dysfunction in oxidative phosphorylation capacity starts as soon as at P10, which is accompanied by an increase in stress response proteins. However, PCx activation ceases at P25, probably due to the rapid cell death that occurs at this age. * $p < 0,05$.

We observed almost the same results at P15 (Fig. 8 D-F) and P25 (Fig. 8 G-I). At both ages, a reduction in oxidative phosphorylation was observed in PCD mice (Fig. 8 D, G; $p = 0.029$ for both comparisons). However, the activation of the response to protein stress changed.

At P15, we saw an increase in PCx (Fig. 8 E) and SHMT2 (Fig. 8 F) labeling in mutant mice (similarly to P10; $p = 0.029$ for both comparisons), whereas at P25, we only found an increase in SHMT2 (Fig. 8 I; $p = 0.029$), while PCx labeling remained similar to the WT mice one (Fig. 8 H; $p > 0.05$). When the respiratory chain is dysfunctional, levels of reactive oxygen species can increase dramatically, leading to increased cellular stress (Motori *et al.*, 2020). Starting with PCx, similar to what other studies have found in cerebellar neurodegeneration with mitochondrial dysfunction (Motori *et al.*, 2020), we detected an increase in its expression in the neuronal somata, whereas in WT mice this enzyme was restricted to adjacent Bergman glia (Waelsch *et al.*, 1964; Yu *et al.*, 1983; Motori *et al.*, 2020). One of the mechanisms by which PCx provides protection against mitochondrial dysfunction is the use of glucose-derived pyruvate to replenish oxaloacetate in the Krebs cycle, which is used for fatty acid and amino acid synthesis when the availability of these nutrients is limited (Kiesel *et al.*, 2021). In addition, the oxaloacetate produced may also contribute to the protection against oxidative stress (Ronnebaum *et al.*, 2006) that Purkinje cells experience, as it increases the expression of factors closely related to mitochondrial quality, such as MTCO1 (Wilkins *et al.*, 2016). Thus, although the stress response is activated from P10 onwards, it may not be sufficient to alleviate the sum of impairments suffered by Purkinje cells (in addition to mitochondrial damage), so these neurons no longer have the plasticity that characterizes them, ending up in a process of neuronal death (Motori *et al.*, 2020).

Finally, we also observed an increase in SHMT2 both at P15 and P25. In cells with mitochondrial DNA damage, there are transcription factors that trigger a robust response to mitochondrial stress, with particular interest in the mitochondrial folate cycle, which is generally found to be induced in affected tissues (Fenech, 2012; Fan *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2020). Precisely, SHMT2 is a key enzyme in this cycle. Several studies have shown that the proper functioning of mitochondrial folate cycle is important for the assembly of electron transport chain complexes and thus for proper oxidative phosphorylation (Rucker *et al.*, 2011; Morscher *et al.*, 2018). Therefore, this cycle has been found to be induced upon mitochondrial damage as it can stimulate oxidative phosphorylation (Anderson *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2016; Mentch *et al.*, 2015; Kottakis *et al.*, 2019).

In this context, our results indicate that mitochondrial dysfunction is an early marker of PCD pre-neurodegeneration, a status that can be more extended than previously described. Furthermore, Purkinje cells from PCD mice exhibit a high degree of metabolic plasticity *in vivo* by upregulating mitochondrial enzymes with neuroprotective properties.

Effect of treatment with rhVEGF-B on mitochondrial quality.

One of the roles of VEGF-B is to maintain proper mitochondrial function (Olsson *et al.*, 2006; Falk *et al.*, 2010; Hagberg *et al.*, 2010; Dhondt *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2014). Therefore, we analyzed the above-mentioned markers –MTCO1, PCx and SHMT2–also in rhVEGF-B-treated PCD mice at P25 to test whether the treatment has beneficial effects on mitochondrial quality.

Analyses were performed at P25, key point in the Purkinje cell death process, and after the complete treatment with rhVEGF-B. Our results showed that MTCO1 levels in PCD-rhVEGF-B mice were similar to those in WT mice (Fig. 9 A; $p > 0.05$), also showing differences with untreated PCD mice (Fig. 9 A; $p < 0.001$). Conversely, the SHMT2-mediated mitochondrial stress response was still active (Fig. 9 C; $p_{\text{PCD}} = 0.024$; $p_{\text{PCD-rhVEGF-B}} = 0.014$, p values from comparisons to WT mice). Moreover, the labeling of PCx in treated mice appeared even higher than in WT (Fig. 9 B; $p = 0.023$) and PCD mice (Fig. 9 B; $p = 0.032$).

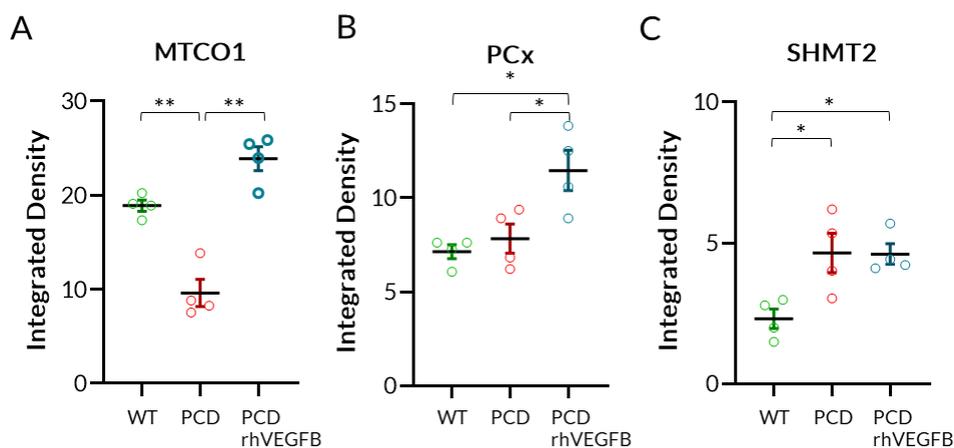


Figure 9. Effect of rhVEGF-B treatment on mitochondrial quality at P25. The graphs show the integrated density of MTCO1 (A), PCx (B) and SHMT2 (C) in WT, PCD and PCD-rhVEGF-B mice. As it can be seen, treatment restores MTCO1 levels, although the stress response remains activated. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Therefore, we observed a recovery of oxidative phosphorylation capacity measured by MTCO1 after treatment. This increase in MTCO1 activity may be because VEGF-B is a target of PGC-1 α (Mehlem *et al.*, 2016), a central regulator within mitochondrial function, that also exerts a protective effect in neurons. On one hand it increases the uptake of long chain fatty acids through FATP1 and FATP4, improving mitochondrial function and reducing oxidative damage (Caballero *et al.*, 2017). On one hand it increases the uptake of long-chain fatty acids through FATP1 and FATP4, improving mitochondrial function and reducing oxidative damage (Caballero *et al.*, 2017). On the other hand, it activates the

transcription factors NRF1 and NRF2 (Corona and Duchon, 2015), which have an enhancing effect on mitochondrial biogenesis (Rowe *et al.*, 2010).

This suggests that VEGF-B either regulates directly PGC-1 α and subsequently increases mitochondrial activity or increases mitochondrial activity and results in PGC-1 α activation to sustain increased ATP production (Caballero *et al.*, 2017).

In parallel, treatment with rhVEGF-B did not reduce the PCx-mediated mitochondrial stress response; on the contrary, we found an increase in this marker compared to both WT and PCD mice. For its part, SHMT2 remained similar to that of PCD mice, and we found an increase with respect to WT mice. Since rhVEGF-B treatment restores MTCO1 levels, while PCx and SHMT2 increase in response to deficiencies in oxidative phosphorylation, this overall increase in stress response proteins may be due to two non-exclusive situations. First, it is possible that although we found increased mitochondrial density, we did not restore mitochondrial functionality, so that activation of the PCx and SHMT2 stress response mechanisms was still required. On the other hand, the response to stress may not be completely turned off after treatment. Indeed, we know that this activation proceeds in time steps (Forsström *et al.*, 2019); however, the mechanisms underlying the activation or inhibition of these responses are not known. Since the treatment started at P10, when MTCO1 was already affected and thus the activation of PCx and SHMT2 had already started, it may result in this mitochondrial stress response remaining active and not being turned off after mitochondrial functional recovery. In addition, we found an increase in PCx in rhVEGF-B-treated mice that was reduced in untreated PCD mice from a previous raise. Since the activation of stress response proteins depends on both the severity and the timing of the onset of damage (Forsström *et al.*, 2019), this increase suggests a delay in mitochondrial dysfunction. On the other hand, these data are consistent with what was observed in the first aim of this thesis: an increase in VEGF-B expression at P15 in PCD mice. Such increase would correspond to changes in oxidative phosphorylation, and an increase in PCx and SHMT2. This expression peak of VEGF-B at P15 seems to be a natural cellular plasticity process that allows neurons to mitigate mitochondrial dysfunction at an early stage. However, at P25 we did not observe VEGF-B changes, and, in this case, we saw that the mitochondrial stress responses in PCD mice ceased, probably due to impending Purkinje cell death. In addition, treatment with rhVEGF-B caused an increase in the stress response and, thus, an increase in neuronal plasticity, which allowed us the alleviation, at least temporarily, of the mitochondrial dysfunction.

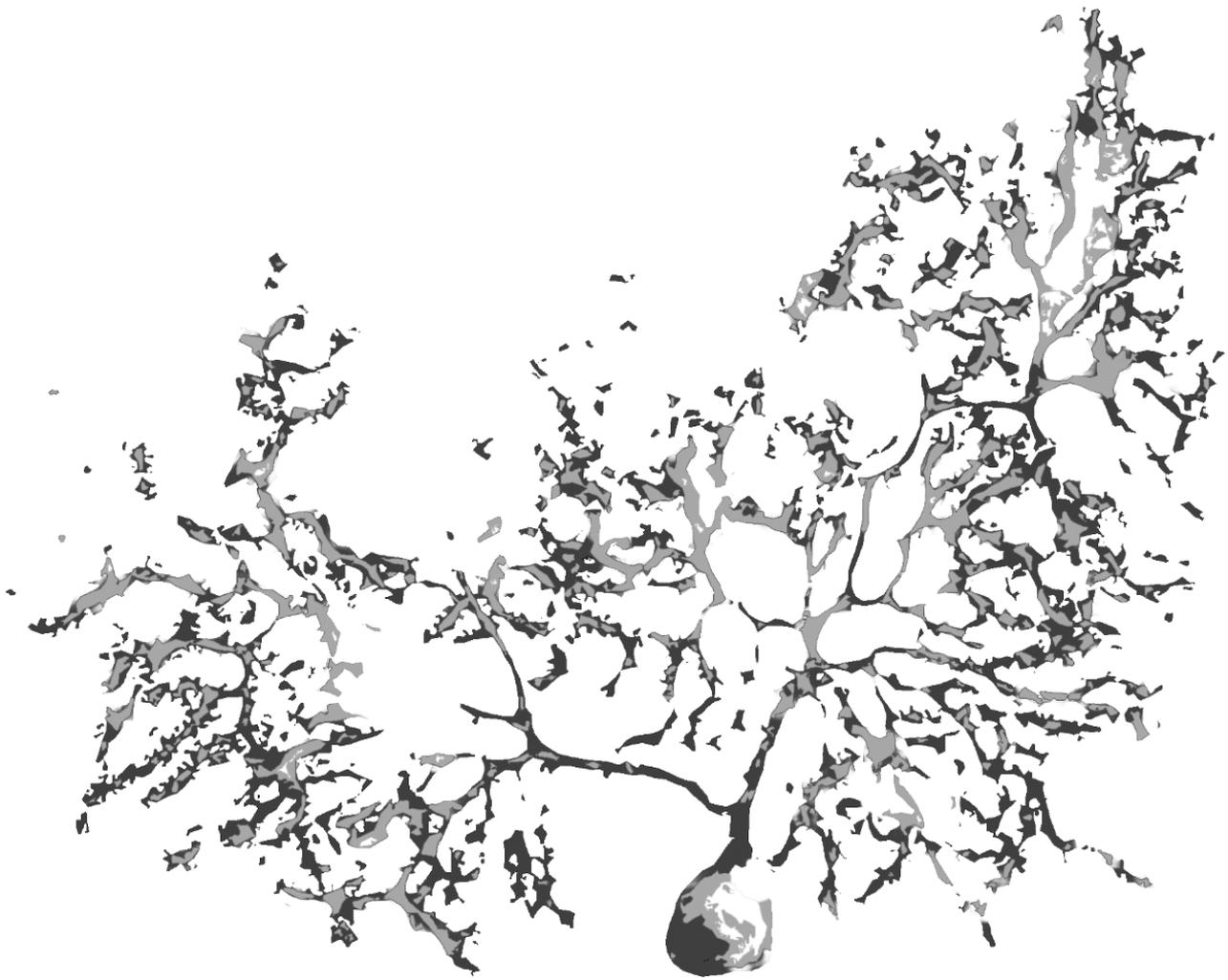
Therefore, we have shown that treatment with VEGF-B has neuroprotective effects on the PCD mutant mouse at both the neuronal and behavioral levels. In addition, we know that it also affects mitochondrial functionality, which is altered prior to the onset of neurodegeneration, and this may be the origin of the neuroprotection observed. Given the neuroprotective capacity of VEGF-B, its proven effect on mitochondria, and the fact that these organelles are often affected in degenerative processes, it seems reasonable to promote research on this substance with a translational (or even clinical) point of view.

CONCLUSIONS

In accordance with the objectives of this Doctoral Thesis, and based on the results obtained and their subsequent discussion, we have reached the following conclusions:

- I. The neurotrophic factors IGF-1 and VEGF-B show an altered expression in PCD mice. Their abnormal fluctuations are related to a specific moment of the degenerative process, VEGF-B being fundamental in the early stages of neurodegeneration and IGF-1 in the later stages. In other words, **the neurodegenerative process in PCD mice is accompanied by changes in the expression of neurotrophic factors, which fluctuate according to the stages of this process.**
- II. Treatment with rhIGF-1 has the systemic effect of increasing body weight in PCD mice. However, it does not have a protective effect on Purkinje cells and does not improve the performance of behavioral tests. Thus, **rhIGF-1 is ineffective against cerebellar degeneration in the PCD mutant mouse.**
- III. Treatment with rhVEGF-B exerts a protective effect on Purkinje cells in the PCD mouse, resulting in a partial improvement of motor, cognitive and social functions. This neuroprotection is mainly due to the inhibition of apoptosis and the amelioration of mitochondrial dysfunction, which is present in mutant mice before the onset of pre-neurodegeneration. Therefore, **rhVEGF-B treatment has remarkable therapeutic effects against neuronal degeneration in PCD mice.**

These results confirm our hypothesis: the treatment with neurotrophic factors, especially VEGF-B, has protective effects against cerebellar degeneration associated with the *pcd* mutation.



BIBLIOGRAFÍA | REFERENCES

- Aase, K., Lymboussaki, A., Kaipainen, A., Olofsson, B., Alitalo, K., y Eriksson, U. (1999). Localization of VEGF-B in the mouse embryo suggests a paracrine role of the growth factor in the developing vasculature. *Dev Dyn*, 215(1), 12-25.
- Aberg, N. D., Blomstrand, F., Aberg, M. A., Bjorklund, U., Carlsson, B., Carlsson-Skwirut, C., Bang, P., Ronnback, L., y Eriksson, P. S. (2003). Insulin-like growth factor-I increases astrocyte intercellular gap junctional communication and connexin43 expression in vitro. *J Neurosci Res*, 74(1), 12-22.
- Adham, I. M., Burkhardt, E., Benahmed, M., y Engel, W. (1993). Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells. *J Biol Chem*, 268(35), 26668-72.
- Anderson, D. D., Quintero, C. M., y Stover, P. J. (2011). Identification of a de novo thymidylate biosynthesis pathway in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(37), 15163-15168.
- Antunes, M., y Biala, G. (2012). The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications. *Cogn Process*, 13(2), 93-110.
- Arjunan, P., Lin, X., Tang, Z., Du, Y., Kumar, A., Liu, L., Yin, X., Huang, L., Chen, W., Chen, Q., Ye, Z., Wang, S., Kuang, H., Zhou, L., Xu, K., Chen, X., Zeng, H., Lu, W., Cao, Y., ... y Li, X. (2018). VEGF-B is a potent antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(41), 10351-10356.
- Azize, N. A., Ngah, W. Z., Othman, Z., Md Desa, N., Chin, C. B., Md Yunus, Z., Mohan, A., Hean, T. S., Syed Zakaria, S. Z., y Lock-Hock, N. (2014). Mutation analysis of glycine decarboxylase, aminomethyltransferase and glycine cleavage system protein-H genes in 13 unrelated families with glycine encephalopathy. *J Hum Genet*, 55(11), 593-597.
- Bach, M. A., Shen-Orr, Z., Lowe, W. L., Jr., Roberts, C. T., Jr., y LeRoith, D. (1991). Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*, 10(1), 43-48.
- Bader, V., y Winklhofer, K. F. (2020). Mitochondria at the interface between neurodegeneration and neuroinflammation. *Semin Cell Dev Biol*, 99, 163-171.
- Baltanás, F. C., Berciano, M. T., Santos, E., y Lafarga, M. (2021). The Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy (CONDCA) Disease Caused by AGTPBP1 Gene Mutations: The Purkinje Cell Degeneration Mouse as an Animal Model for the Study of this Human Disease. *Biomedicines*, 9(9):1157.
- Baltanás, F. C., Berciano, M. T., Tapia, O., Narcis, J. O., Lafarga, V., Díaz, D., Weruaga, E., Santos, E., y Lafarga, M. (2019). Nucleolin reorganization and nucleolar stress in Purkinje cells of mutant PCD mice. *Neurobiol Dis*, 127, 312-322.
- Baltanás, F. C., Berciano, M. T., Valero, J., Gómez, C., Díaz, D., Alonso, J. R., Lafarga, M., y Weruaga, E. (2013). Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice. *Glia*, 61(2), 254-272.
- Baltanás, F. C., Casafont, I., Lafarga, V., Weruaga, E., Alonso, J. R., Berciano, M. T., y Lafarga, M. (2011). Purkinje cell degeneration in pcd mice reveals large scale chromatin reorganization and gene silencing linked to defective DNA repair. *J Biol Chem*, 286(32), 28287-28302.
- Baltanás, F. C., Casafont, I., Weruaga, E., Alonso, J. R., Berciano, M. T., y Lafarga, M. (2011). Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells. *Brain Pathol*, 21(4), 374-388.
- Bao, X. R., Ong, S. E., Goldberger, O., Peng, J., Sharma, R., Thompson, D. A., Vafai, S. B., Cox, A. G., Marutani, E., Ichinose, F., Goessling, W., Regev, A., Carr, S. A., Clish, C. B., y Mootha, V. K. (2016). Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *Elife*, 5, e10575.
- Baron-Van Evercooren, A., Olichon-Berthe, C., Kowalski, A., Visciano, G., y Van Obberghen, E. (1991). Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: a developmental, regional, and cellular analysis. *J Neurosci Res*, 28(2), 244-253.
- Bartkowska, K., Paquin, A., Gauthier, A. S., Kaplan, D. R., y Miller, F. D. (2007). Trk signaling regulates neural precursor cell proliferation and differentiation during cortical development. *Development*, 134(24), 4369-4380.
- Bartolomei, J. C., y Greer, C. A. (1998). The organization of piriform cortex and the lateral olfactory tract following the loss of mitral cells in PCD mice. *Exp Neurol*, 154(2), 537-550.
- Bates, D. O., y Harper, S. J. (2002). Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. *Vascul Pharmacol*, 39(4-5), 225-237.
- Bathgate, R. A., Samuel, C. S., Burazin, T. C., Layfield, S., Claasz, A. A., Reytomas, I. G., Dawson, N. F., Zhao, C., Bond, C., Summers, R. J., Parry, L. J., Wade, J. D., y Tregear, G. W. (2002). Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family. *J Biol Chem*, 277(2), 1148-1157.
- Baurle, J., Helmchen, C., y Grusser-Cornehls, U. (1997). Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in

- Purkinje cell degeneration mutant mice: a possible compensatory mechanism. *J Comp Neurol*, 384(4), 580-596.
- Berezniuk, I., Vu, H. T., Lyons, P. J., Sironi, J. J., Xiao, H., Burd, B., Setou, M., Angeletti, R. H., Ikegami, K., y Fricker, L. D. (2012). Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing alpha- and beta-tubulin. *J Biol Chem*, 287(9), 6503-6517.
- Bergami, M., Rimondini, R., Santi, S., Blum, R., Gotz, M., y Canossa, M. (2008). Deletion of TrkB in adult progenitors alters newborn neuron integration into hippocampal circuits and increases anxiety-like behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(40), 15570-15575.
- Blanks, J. C., Mullen, R. J., y LaVail, M. M. (1982). Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. II. Electron microscopic analysis. *J Comp Neurol*, 212(3), 231-246.
- Blosa, M., Bursch, C., Weigel, S., Holzer, M., Jager, C., Janke, C., Matthews, R. T., Arendt, T., y Morawski, M. (2016). Reorganization of Synaptic Connections and Perineuronal Nets in the Deep Cerebellar Nuclei of Purkinje Cell Degeneration Mutant Mice. *Neural Plast*, 2016, 2828536.
- Bondy, C., y Lee, W. H. (1993). Correlation between insulin-like growth factor (IGF)-binding protein 5 and IGF-I gene expression during brain development. *J Neurosci*, 13(12), 5092-5104.
- Botusan, I. R., Zheng, X., Narayanan, S., Grunler, J., Sunkari, V. G., Calissendorff, F. S., Ansurudeen, I., Illies, C., Svensson, J., Jansson, J. O., Ohlsson, C., Brismar, K., y Catrina, S. B. (2018). Deficiency of liver-derived insulin-like growth factor-I (IGF-I) does not interfere with the skin wound healing rate. *PLoS One*, 13(3), e0193084.
- Bozdagi, O., Tavassoli, T., y Buxbaum, J. D. (2013). Insulin-like growth factor-1 rescues synaptic and motor deficits in a mouse model of autism and developmental delay. *Mol Autism*, 4(1), 9.
- Brooker, G. J., Kalloniatis, M., Russo, V. C., Murphy, M., Werther, G. A., y Bartlett, P. F. (2000). Endogenous IGF-1 regulates the neuronal differentiation of adult stem cells. *J Neurosci Res*, 59(3), 332-341.
- Bry, M., Kivela, R., Leppanen, V. M., y Alitalo, K. (2014). Vascular endothelial growth factor-B in physiology and disease. *Physiol Rev*, 94(3), 779-794.
- Buitrago, M. M., Schulz, J. B., Dichgans, J., y Luft, A. R. (2004). Short and long-term motor skill learning in an accelerated rotarod training paradigm. *Neurobiol Learn Mem*, 81(3), 211-216.
- Caballero, B., Sherman, S. J., y Falk, T. (2017). Insights into the Mechanisms Involved in Protective Effects of VEGF-B in Dopaminergic Neurons. *Parkinsons Dis*, 2017, 4263795.
- Camarero, G., Avendano, C., Fernández-Moreno, C., Villar, A., Contreras, J., de Pablo, F., Pichel, J. G., y Varela-Nieto, I. (2001). Delayed inner ear maturation and neuronal loss in postnatal Igf-1-deficient mice. *J Neurosci*, 21(19), 7630-7641.
- Cao, H., Jin, C., Huang, D., Liu, C., Sun, D., Tan, C., Zhu, X., y Fei, Y. (2013). Changes in serum IGF-1 level and tumor VEGF expression in mice with colorectal cancer under hyperglycemic conditions. *Mol Med Rep*, 7(4), 1361-1365.
- Capoccia, B. J., Huh, W. J., y Mills, J. C. (2009). How form follows functional genomics: gene expression profiling gastric epithelial cells with a particular discourse on the parietal cell. *Physiol Genomics*, 37(2), 67-78.
- Carrascosa, C., Torres-Alemán, I., López-López, C., Carro, E., Espejo, L., Torrado, S., y Torrado, J. J. (2004). Microspheres containing insulin-like growth factor I for treatment of chronic neurodegeneration. *Biomaterials*, 25(4), 707-714.
- Carro, E., Nuñez, A., Busiguina, S., y Torres-Alemán, I. (2000). Circulating insulin-like growth factor I mediates effects of exercise on the brain. *J Neurosci*, 20(8), 2926-2933.
- Carro, E., Trejo, J. L., Busiguina, S., y Torres-Alemán, I. (2001). Circulating insulin-like growth factor I mediates the protective effects of physical exercise against brain insults of different etiology and anatomy. *J Neurosci*, 21(15), 5678-5684.
- Carson, M. J., Behringer, R. R., Brinster, R. L., y McMorris, F. A. (1993). Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron*, 10(4), 729-740.
- Carta, I., Chen, C. H., Schott, A. L., Dorizan, S., y Khodakhah, K. (2019). Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior. *Science*, 363(6424), eaav0581.
- Castro, J., García, R. I., Kwok, S., Banerjee, A., Petravic, J., Woodson, J., Mellios, N., Tropea, D., y Sur, M. (2014). Functional recovery with recombinant human IGF1 treatment in a mouse model of Rett Syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(27), 9941-9946.
- Chakrabarti, L., Eng, J., Ivanov, N., Garden, G. A., y La Spada, A. R. (2009). Autophagy activation and enhanced mitophagy characterize the Purkinje cells of pcd mice prior to neuronal death. *Mol Brain*, 2, 24.
- Chakrabarti, L., Eng, J., Martinez, R. A., Jackson, S., Huang, J., Possin, D. E., Sopher, B. L., y La Spada, A. R. (2008). The zinc-binding domain of Nna1 is required to prevent retinal photoreceptor loss and

cerebellar ataxia in Purkinje cell degeneration (pcd) mice. *Vision Res*, 48(19), 1999-2005.

Chakrabarti, L., Zahra, R., Jackson, S. M., Kazemi-Esfarjani, P., Sopher, B. L., Mason, A. G., Toneff, T., Ryu, S., Shaffer, S., Kansy, J. W., Eng, J., Merrihew, G., MacCoss, M. J., Murphy, A., Goodlett, D. R., Hook, V., Bennett, C. L., Pallanck, L. J., y La Spada, A. R. (2010). Mitochondrial dysfunction in NnaD mutant flies and Purkinje cell degeneration mice reveals a role for Nna proteins in neuronal bioenergetics. *Neuron*, 66(6), 835-847.

Chan, J. P., Cordeira, J., Calderon, G. A., Iyer, L. K., y Rios, M. (2008). Depletion of central BDNF in mice impedes terminal differentiation of new granule neurons in the adult hippocampus. *Mol Cell Neurosci*, 39(3), 372-383.

Chassin, D., Laurent, A., Janneau, J. L., Berger, R., y Bellet, D. (1995). Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta. *Genomics*, 29(2), 465-470.

Chen, S. D., Wu, C. L., Hwang, W. C., y Yang, D. I. (2017). More Insight into BDNF against Neurodegeneration: Anti-Apoptosis, Anti-Oxidation, and Suppression of Autophagy. *Int J Mol Sci*, 18(3), 545.

Cheng, A., Hou, Y., y Mattson, M. P. (2010). Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro*, 2(5), e00045.

Cheng, C. M., Mervis, R. F., Niu, S. L., Salem, N., Jr., Witters, L. A., Tseng, V., Reinhardt, R., y Bondy, C. A. (2003). Insulin-like growth factor 1 is essential for normal dendritic growth. *J Neurosci Res*, 73(1), 1-9.

Colucci-D'Amato, L., Speranza, L., y Volpicelli, F. (2020). Neurotrophic Factor BDNF, Physiological Functions and Therapeutic Potential in Depression, Neurodegeneration and Brain Cancer. *Int J Mol Sci*, 21(20), 7777.

Conklin, D., Lofton-Day, C. E., Haldeman, B. A., Ching, A., Whitmore, T. E., Lok, S., y Jaspers, S. (1999). Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily. *Genomics*, 60(1), 50-56.

Consalez, G. G., Goldowitz, D., Casoni, F., y Hawkes, R. (2020). Origins, Development, and Compartmentation of the Granule Cells of the Cerebellum. *Front Neural Circuits*, 14, 611841.

Contreras, P. C., Vaught, J. L., Gruner, J. A., Brosnan, C., Steffler, C., Arezzo, J. C., Lewis, M. E., Kessler, J. A., y Apfel, S. C. (1997). Insulin-like growth factor-I prevents development of a vincristine neuropathy in mice. *Brain Res*, 774(1-2), 20-26.

Corona, J. C., y Duchon, M. R. (2015). PPARgamma and PGC-1alpha as therapeutic targets in Parkinson's. *Neurochem Res*, 40(2), 308-316.

Daughaday, W. H., y Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr Rev*, 10(1), 68-91.

del Pilar, C., Lebrón-Galán, R., Pérez-Martín, E., Pérez-Revuelta, L., Ávila-Zarza, C. A., Alonso, J. R., Clemente, D., Weruaga, E., y Díaz, D. (2021). The Selective Loss of Purkinje Cells Induces Specific Peripheral Immune Alterations. *Front Cell Neurosci*, 15, 773696.

Delis, F., Mitsacos, A., y Giompres, P. (2004). Dopamine receptor and transporter levels are altered in the brain of Purkinje Cell Degeneration mutant mice. *Neuroscience*, 125(1), 255-268.

Dhondt, J., Peeraer, E., Verheyen, A., Nuydens, R., Buyschaert, I., Poesen, K., Van Geyte, K., Beerens, M., Shibuya, M., Haigh, J. J., Meert, T., Carmeliet, P., y Lambrechts, D. (2011). Neuronal FLT1 receptor and its selective ligand VEGF-B protect against retrograde degeneration of sensory neurons. *FASEB J*, 25(5), 1461-1473.

Díaz, D., del Pilar, C., Carretero, J., Alonso, J. R., y Weruaga, E. (2019). Daily bone marrow cell transplantations for the management of fast neurodegenerative processes. *J Tissue Eng Regen Med*, 13(9), 1702-1711.

Díaz, D., Lepousez, G., Gheusi, G., Alonso, J. R., Lledo, P. M., y Weruaga, E. (2012). Bone marrow cell transplantation restores olfaction in the degenerated olfactory bulb. *J Neurosci*, 32(26), 9053-9058.

Díaz, D., Piquer-Gil, M., Recio, J. S., Martínez-Losa, M. M., Alonso, J. R., Weruaga, E., y Álvarez-Dolado, M. (2018). Bone marrow transplantation improves motor activity in a mouse model of ataxia. *J Tissue Eng Regen Med*, 12(4), e1950-e1961.

Díaz, D., Recio, J. S., Weruaga, E., y Alonso, J. R. (2012). Mild cerebellar neurodegeneration of aged heterozygous PCD mice increases cell fusion of Purkinje and bone marrow-derived cells. *Cell Transplant*, 21(7), 1595-1602.

Doulazmi, M., Capone, F., Frederic, F., Bakouche, J., Lemaigre-Dubreuil, Y., y Mariani, J. (2006). Cerebellar purkinje cell loss in heterozygous rora^{+/-} mice: a longitudinal study. *J Neurogenet*, 20(1-2), 1-17.

Du Preez, A., Law, T., Onorato, D., Lim, Y. M., Eiben, P., Musaelyan, K., Egeland, M., Hye, A., Zunszain, P. A., Thuret, S., Pariante, C. M., y Fernandes, C. (2020). The type of stress matters: repeated injection and permanent social isolation stress in male mice have a differential effect on anxiety- and depressive-like behaviours, and associated biological alterations. *Transl Psychiatry*, 10(1), 325.

Dyer, A. H., Vahdatpour, C., Sanfeliu, A., y Tropea, D. (2016). The role of Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) in brain development, maturation and neuroplasticity. *Neuroscience*, 325, 89-99.

Edelmann, E., Lessmann, V., y Brigadski, T. (2014). Pre- and postsynaptic twists in BDNF secretion and action in synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, 76 Pt C, 610-627.

Ennaceur, A. (2010). One-trial object recognition in rats and mice: methodological and theoretical issues. *Behav Brain Res*, 215(2), 244-254.

Ennaceur, A., y Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav Brain Res*, 31(1), 47-59.

Eyman, M., Cefaliello, C., Mandile, P., Piscopo, S., Crispino, M., y Giuditta, A. (2013). Training old rats selectively modulates synaptosomal protein synthesis. *J Neurosci Res*, 91(1), 20-29.

Falk, T., González, R. T., y Sherman, S. J. (2010). The yin and yang of VEGF and PEDF: multifaceted neurotrophic factors and their potential in the treatment of Parkinson's Disease. *Int J Mol Sci*, 11(8), 2875-2900.

Falk, T., Yue, X., Zhang, S., McCourt, A. D., Yee, B. J., González, R. T., y Sherman, S. J. (2011). Vascular endothelial growth factor-B is neuroprotective in an in vivo rat model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett*, 496(1), 43-47.

Falk, T., Zhang, S., y Sherman, S. J. (2009). Vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) is up-regulated and exogenous VEGF-B is neuroprotective in a culture model of Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*, 4, 49.

Fan, J., Ye, J., Kamphorst, J. J., Shlomi, T., Thompson, C. B., y Rabinowitz, J. D. (2014). Quantitative flux analysis reveals folate-dependent NADPH production. *Nature*, 510(7504), 298-302.

Fatemi, S. H., Aldinger, K. A., Ashwood, P., Bauman, M. L., Blaha, C. D., Blatt, G. J., Chauhan, A., Chauhan, V., Dager, S. R., Dickson, P. E., Estes, A. M., Goldowitz, D., Heck, D. H., Kemper, T. L., King, B. H., Martin, L. A., Millen, K. J., Mittleman, G., Mosconi, M. W., ... y Welsh, J. P. (2012). Consensus paper: pathological role of the cerebellum in autism. *Cerebellum*, 11(3), 777-807.

Felten, D. L., Felten, S. Y., Perry, K. W., Fuller, R. W., Nurnberger, J. I., y Ghetti, B. (1986). Noradrenergic innervation of the cerebellar cortex in normal and in Purkinje cell degeneration mutant mice: evidence for long term survival following loss of the two major cerebellar cortical neuronal populations. *Neuroscience*, 18(4), 783-793.

Fenech, M. (2012). Folate (vitamin B9) and vitamin B12 and their function in the maintenance of nuclear and mitochondrial genome integrity. *Mutat Res*, 733(1-2), 21-33.

Fernández-González, A., La Spada, A. R., Treadaway, J., Higdon, J. C., Harris, B. S., Sidman, R. L., Morgan, J. I., y Zuo, J. (2002). Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, *Nna1*. *Science*, 295(5561), 1904-1906.

Fernández, A. M., Carro, E. M., López-López, C., y Torres-Alemán, I. (2005). Insulin-like growth factor I treatment for cerebellar ataxia: addressing a common pathway in the pathological cascade? *Brain Res Brain Res Rev*, 50(1), 134-141.

Fernández, A. M., de la Vega, A. G., y Torres-Alemán, I. (1998). Insulin-like growth factor I restores motor coordination in a rat model of cerebellar ataxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(3), 1253-1258.

Fernández, A. M., González de la Vega, A. G., Planas, B., y Torres-Alemán, I. (1999). Neuroprotective actions of peripherally administered insulin-like growth factor I in the injured olivo-cerebellar pathway. *Eur J Neurosci*, 11(6), 2019-2030.

Fernández, A. M., y Torres-Alemán, I. (2012). The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci*, 13(4), 225-239.

Ferrara, N., y Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*, 18(1), 4-25.

Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P., y Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 3(5), 391-400.

Fogel, B. L., y Perlman, S. (2007). Clinical features and molecular genetics of autosomal recessive cerebellar ataxias. *Lancet Neurol*, 6(3), 245-257.

Foltran, R. B., y Díaz, S. L. (2016). BDNF isoforms: a round trip ticket between neurogenesis and serotonin? *J Neurochem*, 138(2), 204-221.

Ford, G. D., Ford, B. D., Steele, E. C., Jr., Gates, A., Hood, D., Matthews, M. A. B., Mirza, S., y MacLeish, P. R. (2008). Analysis of transcriptional profiles and functional clustering of global cerebellar gene expression in PCD3J mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 377(2), 556-561.

Forsström, S., Jackson, C. B., Carroll, C. J., Kuronen, M., Pirinen, E., Pradhan, S., Marmyleva, A., Auranen, M., Kleine, I. M., Khan, N. A., Roivainen, A., Marjamaki, P., Liljenback, H., Wang, L., Battersby, B. J., Richter, U., Velagapudi, V., Nikkanen, J., Euro, L., y Suomalainen, A. (2019). Fibroblast Growth Factor 21 Drives Dynamics of Local and Systemic Stress Responses in

- Mitochondrial Myopathy with mtDNA Deletions. *Cell Metab*, 30(6), 1040-1054 e1047.
- Fransson, S., Ruusala, A., y Aspenstrom, P. (2006). The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 344(2), 500-510.
- Freeman, M. R., Schneck, F. X., Gagnon, M. L., Corless, C., Soker, S., Niknejad, K., Peoples, G. E., y Klagsbrun, M. (1995). Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res*, 55(18), 4140-4145.
- Frisen, J., Verge, V. M., Fried, K., Risling, M., Persson, H., Trotter, J., Hokfelt, T., y Lindholm, D. (1993). Characterization of glial trkB receptors: differential response to injury in the central and peripheral nervous systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(11), 4971-4975.
- Gao, X., Smith, G. M., y Chen, J. (2009). Impaired dendritic development and synaptic formation of postnatal-born dentate gyrus granular neurons in the absence of brain-derived neurotrophic factor signaling. *Exp Neurol*, 215(1), 178-190.
- García-Esparcia, P., Sideris-Lampretsas, G., Hernández-Ortega, K., Grau-Rivera, O., Sklaviadis, T., Gelpi, E., y Ferrer, I. (2017). Altered mechanisms of protein synthesis in frontal cortex in Alzheimer disease and a mouse model. *Am J Neurodegener Dis*, 6(2), 15-25.
- Gavrieli, Y., Sherman, Y., y Ben-Sasson, S. A. (1992). Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*, 119(3), 493-501.
- Ghetti, B., Norton, J., y Triarhou, L. C. (1987). Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of "Purkinje cell degeneration" mutant mice. *J Comp Neurol*, 260(3), 409-422.
- Ghetti, B., Perry, K. W., y Fuller, R. W. (1988). Serotonin concentration and turnover in cerebellum and other brain regions of pcd mutant mice. *Brain Res*, 458(2), 367-371.
- Gillardon, F., Baurle, J., Wickert, H., Grusser-Cornehls, U., y Zimmermann, M. (1995). Differential regulation of bcl-2, bax, c-fos, junB, and krox-24 expression in the cerebellum of Purkinje cell degeneration mutant mice. *J Neurosci Res*, 41(5), 708-715.
- Gilmore-Hall, S., Kuo, J., Ward, J. M., Zahra, R., Morrison, R. S., Perkins, G., y La Spada, A. R. (2019). CCP1 promotes mitochondrial fusion and motility to prevent Purkinje cell neuron loss in pcd mice. *J Cell Biol*, 218(1), 206-219.
- González-Rodríguez, P., Zampese, E., Stout, K. A., Guzman, J. N., Ilijic, E., Yang, B., Tkatch, T., Stavarache, M. A., Wokosin, D. L., Gao, L., Kaplitt, M. G., López-Barneo, J., Schumacker, P. T., y Surmeier, D. J. (2022). Author Correction: Disruption of mitochondrial complex I induces progressive parkinsonism. *Nature*, 603(7899), E1.
- González, A., Moya-Alvarado, G., González-Billaut, C., y Bronfman, F. C. (2016). Cellular and molecular mechanisms regulating neuronal growth by brain-derived neurotrophic factor. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 73(10), 612-628.
- Goodlett, C. R., Hamre, K. M., y West, J. R. (1992). Dissociation of spatial navigation and visual guidance performance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Behav Brain Res*, 47(2), 129-141.
- Góra-Kupilas, K., y Josko, J. (2005). The neuroprotective function of vascular endothelial growth factor (VEGF). *Folia Neuropathol*, 43(1), 31-39.
- Greer, C. A., y Shepherd, G. M. (1982). Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). *Brain Res*, 235(1), 156-161.
- Grillo, M. A. (1970). Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. *J Cell Biol*, 45(1), 100-117.
- Grüsser-Cornehls, U., y Baurle, J. (2001). Mutant mice as a model for cerebellar ataxia. *Prog Neurobiol*, 63(5), 489-540.
- Guaiquil, V. H., Pan, Z., Karagianni, N., Fukuoka, S., Alegre, G., y Rosenblatt, M. I. (2014). VEGF-B selectively regenerates injured peripheral neurons and restores sensory and trophic functions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(48), 17272-17277.
- Haeusler, A. R., Donnelly, C. J., Periz, G., Simko, E. A., Shaw, P. G., Kim, M. S., Maragakis, N. J., Troncoso, J. C., Pandey, A., Sattler, R., Rothstein, J. D., y Wang, J. (2014). C9orf72 nucleotide repeat structures initiate molecular cascades of disease. *Nature*, 507(7491), 195-200.
- Hagberg, C. E., Falkevall, A., Wang, X., Larsson, E., Huusko, J., Nilsson, I., van Meeteren, L. A., Samen, E., Lu, L., Vanwildemeersch, M., Klar, J., Genove, G., Pietras, K., Stone-Elander, S., Claesson-Welsh, L., Yla-Herttuala, S., Lindahl, P., y Eriksson, U. (2010). Vascular endothelial growth factor B controls endothelial fatty acid uptake. *Nature*, 464(7290), 917-921.
- Handel, M. A., y Dawson, M. (1981). Effects on spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutation, Purkinje cell degeneration. *Gamete Res*, 4, 185-192.
- Hantaï, D., Akaaboune, M., Lagord, C., Murawsky, M., Houenou, L. J., Festoff, B. W., Vaught, J. L.,

- Rieger, F., y Blondet, B. (1995). Beneficial effects of insulin-like growth factor-I on wobbler mouse motoneuron disease. *J Neurol Sci*, 129 Suppl, 122-126.
- Harvey, S., Carragher, M., Dickey, M. W., Pierce, J. E., y Rose, M. L. (2022). Dose effects in behavioural treatment of post-stroke aphasia: a systematic review and meta-analysis. *Disabil Rehabil*, 44(12), 2548-2559.
- Hernández-Ortega, K., García-Esparcia, P., Gil, L., Lucas, J. J., y Ferrer, I. (2016). Altered Machinery of Protein Synthesis in Alzheimer's: From the Nucleolus to the Ribosome. *Brain Pathol*, 26(5), 593-605.
- Hernández-Pérez, C., Weruaga, E., Díaz, D. (2023). Lobe X of the Cerebellum: A Natural Neuro-Resistant Region. *Anatomía*, 2, 43-62.
- Hetman, M., y Pietrzak, M. (2012). Emerging roles of the neuronal nucleolus. *Trends Neurosci*, 35(5), 305-314.
- Hiratsuka, S., Minowa, O., Kuno, J., Noda, T., y Shibuya, M. (1998). Flt-1 lacking the tyrosine kinase domain is sufficient for normal development and angiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16), 9349-9354.
- Hofer, M., Pagliusi, S. R., Hohn, A., Leibrock, J., y Barde, Y. A. (1990). Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J*, 9(8), 2459-2464.
- Hohn, A., Leibrock, J., Bailey, K., y Barde, Y. A. (1990). Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor/brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*, 344(6264), 339-341.
- Huang, D., Zhao, C., Ju, R., Kumar, A., Tian, G., Huang, L., Zheng, L., Li, X., Liu, L., Wang, S., Ren, X., Ye, Z., Chen, W., Xing, L., Chen, Q., Gao, Z., Mi, J., Tang, Z., Wang, B., ... y Li, X. (2016). VEGF-B inhibits hyperglycemia- and Macugen-induced retinal apoptosis. *Sci Rep*, 6, 26059.
- Huat, T. J., Khan, A. A., Pati, S., Mustafa, Z., Abdullah, J. M., y Jaafar, H. (2014). IGF-1 enhances cell proliferation and survival during early differentiation of mesenchymal stem cells to neural progenitor-like cells. *BMC Neurosci*, 15, 91.
- Hudson, P., Haley, J., John, M., Cronk, M., Crawford, R., Haralambidis, J., Tregear, G., Shine, J., y Niall, H. (1983). Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin. *Nature*, 301(5901), 628-631.
- Hudson, P., John, M., Crawford, R., Haralambidis, J., Scanlon, D., Gorman, J., Tregear, G., Shine, J., y Niall, H. (1984). Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones. *EMBO J*, 3(10), 2333-2339.
- Hurtado-Chong, A., Yusta-Boyo, M. J., Vergano-Vera, E., Bulfone, A., de Pablo, F., y Vicario-Abejón, C. (2009). IGF-I promotes neuronal migration and positioning in the olfactory bulb and the exit of neuroblasts from the subventricular zone. *Eur J Neurosci*, 30(5), 742-755.
- Ip, N. Y., Ibañez, C. F., Nye, S. H., McClain, J., Jones, P. F., Gies, D. R., Belluscio, L., Le Beau, M. M., Espinosa, R., 3rd, Squinto, S. P., Persson, H., y Yancopoulos, G. D. (1992). Mammalian neurotrophin-4: structure, chromosomal localization, tissue distribution, and receptor specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(7), 3060-3064.
- Itami, C., Kimura, F., Kohno, T., Matsuoka, M., Ichikawa, M., Tsumoto, T., y Nakamura, S. (2003). Brain-derived neurotrophic factor-dependent unmasking of "silent" synapses in the developing mouse barrel cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(22), 13069-13074.
- Ito, M. (2006). Cerebellar circuitry as a neuronal machine. *Prog Neurobiol*, 78(3-5), 272-303.
- Jaworski, J., Spangler, S., Seeburg, D. P., Hoogenraad, C. C., y Sheng, M. (2005). Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*, 25(49), 11300-11312.
- Kalinina, E., Biswas, R., Berezniuk, I., Hermoso, A., Aviles, F. X., y Fricker, L. D. (2007). A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. *FASEB J*, 21(3), 836-850.
- Karakaya, M., Paketci, C., Altmueller, J., Thiele, H., Hoelker, I., Yis, U., y Wirth, B. (2019). Biallelic variant in AGTPBP1 causes infantile lower motor neuron degeneration and cerebellar atrophy. *Am J Med Genet A*, 179(8), 1580-1584.
- Katoh-Semba, R., Asano, T., Ueda, H., Morishita, R., Takeuchi, I. K., Inaguma, Y., y Kato, K. (2002). Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J*, 16(10), 1328-1330.
- Kevil, C. G., Payne, D. K., Mire, E., y Alexander, J. S. (1998). Vascular permeability factor/vascular endothelial cell growth factor-mediated permeability occurs through disorganization of endothelial junctional proteins. *J Biol Chem*, 273(24), 15099-15103.
- Khan, N. A., Nikkanen, J., Yatsuga, S., Jackson, C., Wang, L., Pradhan, S., Kivela, R., Pessia, A., Velagapudi, V., y Suomalainen, A. (2017). mTORC1 Regulates Mitochondrial Integrated Stress Response and Mitochondrial Myopathy Progression. *Cell Metab*, 26(2), 419-428 e415.

- Kiesel, V. A., Sheeley, M. P., Coleman, M. F., Cotul, E. K., Donkin, S. S., Hursting, S. D., Wendt, M. K., y Teegarden, D. (2021). Pyruvate carboxylase and cancer progression. *Cancer Metab*, *9*(1), 20.
- Kim, N., Xiao, R., Choi, H., Jo, H., Kim, J. H., Uhm, S. J., y Park, C. (2011). Abnormal sperm development in *pcd(3J)*^{-/-} mice: the importance of *Agtppb1* in spermatogenesis. *Mol Cells*, *31*(1), 39-48.
- Kottakis, F., Nicolay, B. N., Roumane, A., Karnik, R., Gu, H., Nagle, J. M., Boukhali, M., Hayward, M. C., Li, Y. Y., Chen, T., Liesa, M., Hammerman, P. S., Wong, K. K., Hayes, D. N., Shirihai, O. S., Dyson, N. J., Haas, W., Meissner, A., y Bardeesy, N. (2019). Author Correction: LKB1 loss links serine metabolism to DNA methylation and tumorigenesis. *Nature*, *575*(7783), E5.
- Koutsopoulos, O. S., Laine, D., Osellame, L., Chudakov, D. M., Parton, R. G., Frazier, A. E., y Ryan, M. T. (2010). Human Mitons associate with mitochondria and induce microtubule-dependent remodeling of mitochondrial networks. *Biochim Biophys Acta*, *1803*(5), 564-574.
- Kowianski, P., Lietzau, G., Czuba, E., Waskow, M., Steliga, A., y Morys, J. (2018). BDNF: A Key Factor with Multipotent Impact on Brain Signaling and Synaptic Plasticity. *Cell Mol Neurobiol*, *38*(3), 579-593.
- Kühl, I., Miranda, M., Atanassov, I., Kuznetsova, I., Hinze, Y., Mourier, A., Filipovska, A., y Larsson, N. G. (2017). Transcriptomic and proteomic landscape of mitochondrial dysfunction reveals secondary coenzyme Q deficiency in mammals. *Elife*, *6*, e30952.
- Kumar, V., Zhang, M. X., Swank, M. W., Kunz, J., y Wu, G. Y. (2005). Regulation of dendritic morphogenesis by Ras-PI3K-Akt-mTOR and Ras-MAPK signaling pathways. *J Neurosci*, *25*(49), 11288-11299.
- Kyuhou, S., Kato, N., y Gemba, H. (2006). Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci Lett*, *396*(2), 91-96.
- Laine, J., y Axelrad, H. (1994). The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. *J Comp Neurol*, *339*(2), 159-173.
- Lalonde, R., y Strazielle, C. (2003). The effects of cerebellar damage on maze learning in animals. *Cerebellum*, *2*(4), 300-309.
- Lalonde, R., y Strazielle, C. (2019). Motor Performances of Spontaneous and Genetically Modified Mutants with Cerebellar Atrophy. *Cerebellum*, *18*(3), 615-634.
- Landis, S. C., y Mullen, R. J. (1978). The development and degeneration of Purkinje cells in *pcd* mutant mice. *J Comp Neurol*, *177*(1), 125-143.
- Langlet, C., Bastide, B., y Canu, M. H. (2012). Hindlimb unloading affects cortical motor maps and decreases corticospinal excitability. *Exp Neurol*, *237*(1), 211-217.
- Laron, Z. (2001). Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Mol Pathol*, *54*(5), 311-316.
- Le Marec, N., y Lalonde, R. (1997). Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res*, *768*(1-2), 310-316.
- Ledda, F., y Paratcha, G. (2016). Assembly of Neuronal Connectivity by Neurotrophic Factors and Leucine-Rich Repeat Proteins. *Front Cell Neurosci*, *10*, 199.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., y Roberts, C. T., Jr. (1995). Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*, *16*(2), 143-163.
- Lessmann, V., y Brigadski, T. (2009). Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update. *Neurosci Res*, *65*(1), 11-22.
- Li, J., Gu, X., Ma, Y., Calicchio, M. L., Kong, D., Teng, Y. D., Yu, L., Crain, A. M., Vartanian, T. K., Pasqualini, R., Arap, W., Libermann, T. A., Snyder, E. Y., y Sidman, R. L. (2010). *Nna1* mediates Purkinje cell dendritic development via lysyl oxidase propeptide and NF-kappaB signaling. *Neuron*, *68*(1), 45-60.
- Li, J., Snyder, E. Y., Tang, F. H. F., Pasqualini, R., Arap, W., y Sidman, R. L. (2020). *Nna1* gene deficiency triggers Purkinje neuron death by tubulin hyperglutamylation and ER dysfunction. *JCI Insight*, *5*(19), e136078.
- Li, Q., Zhao, B., Li, W., He, Y., Tang, X., Zhang, T., Zhong, Z., Pan, Q., y Zhang, Y. (2022). Effects of repeated drug administration on behaviors in normal mice and fluoxetine efficacy in chronic unpredictable mild stress mice. *Biochem Biophys Res Commun*, *615*, 36-42.
- Li, X., Tjwa, M., Van Hove, I., Enholm, B., Neven, E., Paavonen, K., Jeltsch, M., Juan, T. D., Sievers, R. E., Chorianopoulos, E., Wada, H., Vanwildemeersch, M., Noel, A., Foidart, J. M., Springer, M. L., von Degenfeld, G., Dewerchin, M., Blau, H. M., Alitalo, K., ... y Moons, L. (2008). Reevaluation of the role of VEGF-B suggests a restricted role in the revascularization of the ischemic myocardium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *28*(9), 1614-1620.
- Li, X., Xu, G., Wang, Y., Xu, X., Liu, X., Tang, S., Zhang, F., Zhang, J., Tang, L., Wu, Q., Luo, D., Ke, X., y Group, A. S. (2014). Safety and efficacy of conbercept in neovascular age-related macular degeneration: results from a 12-month randomized phase 2 study: AURORA study. *Ophthalmology*, *121*(9), 1740-1747.

- Li, Y., Zhang, F., Nagai, N., Tang, Z., Zhang, S., Scotney, P., Lennartsson, J., Zhu, C., Qu, Y., Fang, C., Hua, J., Matsuo, O., Fong, G. H., Ding, H., Cao, Y., Becker, K. G., Nash, A., Heldin, C. H., y Li, X. (2008). VEGF-B inhibits apoptosis via VEGFR-1-mediated suppression of the expression of BH3-only protein genes in mice and rats. *J Clin Invest*, *118*(3), 913-923.
- Lin, Y. S., Cheng, W. L., Chang, J. C., Lin, T. T., Chao, Y. C., y Liu, C. S. (2022). IGF-1 as a Potential Therapy for Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Biomedicines*, *10*(2):505.
- Lok, S., Johnston, D. S., Conklin, D., Lofton-Day, C. E., Adams, R. L., Jelmsberg, A. C., Whitmore, T. E., Schrader, S., Griswold, M. D., y Jaspers, S. R. (2000). Identification of INSL6, a new member of the insulin family that is expressed in the testis of the human and rat. *Biol Reprod*, *62*(6), 1593-1599.
- Lynch, M. A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev*, *84*(1), 87-136.
- M**achado, A. S., Darmohray, D. M., Fayad, J., Marques, H. G., y Carey, M. R. (2015). A quantitative framework for whole-body coordination reveals specific deficits in freely walking ataxic mice. *Elife*, *4*, e07892.
- Machado, A. S., Marques, H. G., Duarte, D. F., Darmohray, D. M., y Carey, M. R. (2020). Shared and specific signatures of locomotor ataxia in mutant mice. *Elife*, *9*, e55356.
- Magiera, M. M., Bodakuntla, S., Ziak, J., Lacomme, S., Marques Sousa, P., Leboucher, S., Hausrat, T. J., Bosc, C., Andrieux, A., Kneussel, M., Landry, M., Calas, A., Balastik, M., y Janke, C. (2018). Excessive tubulin polyglutamylation causes neurodegeneration and perturbs neuronal transport. *EMBO J*, *37*(23), e100440.
- Maisonpierre, P. C., Belluscio, L., Squinto, S., Ip, N. Y., Furth, M. E., Lindsay, R. M., y Yancopoulos, G. D. (1990). Neurotrophin-3: a neurotrophic factor related to NGF and BDNF. *Science*, *247*(4949 Pt 1), 1446-1451.
- Manto, M., Bower, J. M., Conforto, A. B., Delgado-García, J. M., da Guarda, S. N., Gerwig, M., Habas, C., Hagura, N., Ivry, R. B., Marien, P., Molinari, M., Naito, E., Nowak, D. A., Oulad Ben Taib, N., Pelisson, D., Tesche, C. D., Tilikete, C., y Timmann, D. (2012). Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement. *Cerebellum*, *11*(2), 457-487.
- Marchena, M., Lara, J., Aijón, J., Germain, F., de la Villa, P., y Velasco, A. (2011). The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study. *Exp Eye Res*, *93*(5), 607-617.
- Mariga, A., Zavadil, J., Ginsberg, S. D., y Chao, M. V. (2015). Withdrawal of BDNF from hippocampal cultures leads to changes in genes involved in synaptic function. *Dev Neurobiol*, *75*(2), 173-192.
- Markowska, A. L., Mooney, M., y Sonntag, W. E. (1998). Insulin-like growth factor-1 ameliorates age-related behavioral deficits. *Neuroscience*, *87*(3), 559-569.
- Martin, K. B., Williams, I. M., Cluzeau, C. V., Coughnoux, A., Dale, R. K., Iben, J. R., Cawley, N. X., Wassif, C. A., y Porter, F. D. (2019). Identification of Novel Pathways Associated with Patterned Cerebellar Purkinje Neuron Degeneration in Niemann-Pick Disease, Type C1. *Int J Mol Sci*, *21*(1), 292.
- Matthews, W., Jordan, C. T., Gavin, M., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., y Lemischka, I. R. (1991). A receptor tyrosine kinase cDNA isolated from a population of enriched primitive hematopoietic cells and exhibiting close genetic linkage to c-kit. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *88*(20), 9026-9030.
- McCusker, R. H., McCrea, K., Zunich, S., Dantzer, R., Broussard, S. R., Johnson, R. W., y Kelley, K. W. (2006). Insulin-like growth factor-I enhances the biological activity of brain-derived neurotrophic factor on cerebrocortical neurons. *J Neuroimmunol*, *179*(1-2), 186-190.
- McMorris, F. A., Mozell, R. L., Carson, M. J., Shinar, Y., Meyer, R. D., y Marchetti, N. (1993). Regulation of oligodendrocyte development and central nervous system myelination by insulin-like growth factors. *Ann NY Acad Sci*, *692*, 321-334.
- Mehlem, A., Palombo, I., Wang, X., Hagberg, C. E., Eriksson, U., y Falkevall, A. (2016). PGC-1alpha Coordinates Mitochondrial Respiratory Capacity and Muscular Fatty Acid Uptake via Regulation of VEGF-B. *Diabetes*, *65*(4), 861-873.
- Melter, M., Reinders, M. E., Sho, M., Pal, S., Geehan, C., Denton, M. D., Mukhopadhyay, D., y Briscoe, D. M. (2000). Ligation of CD40 induces the expression of vascular endothelial growth factor by endothelial cells and monocytes and promotes angiogenesis in vivo. *Blood*, *96*(12), 3801-3808.
- Mentch, S. J., Mehrmohamadi, M., Huang, L., Liu, X., Gupta, D., Mattocks, D., Gomez Padilla, P., Ables, G., Bamman, M. M., Thalacker-Mercer, A. E., Nichenametla, S. N., y Locasale, J. W. (2015). Histone Methylation Dynamics and Gene Regulation Occur through the Sensing of One-Carbon Metabolism. *Cell Metab*, *22*(5), 861-873.
- Milne, S. C., Corben, L. A., Yiu, E., Delatycki, M. B., y Georgiou-Karistianis, N. (2016). Gastrocnemius and soleus spasticity and muscle length in Friedreich's ataxia. *J Clin Neurosci*, *29*, 29-34.
- Miquerol, L., Langille, B. L., y Nagy, A. (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor

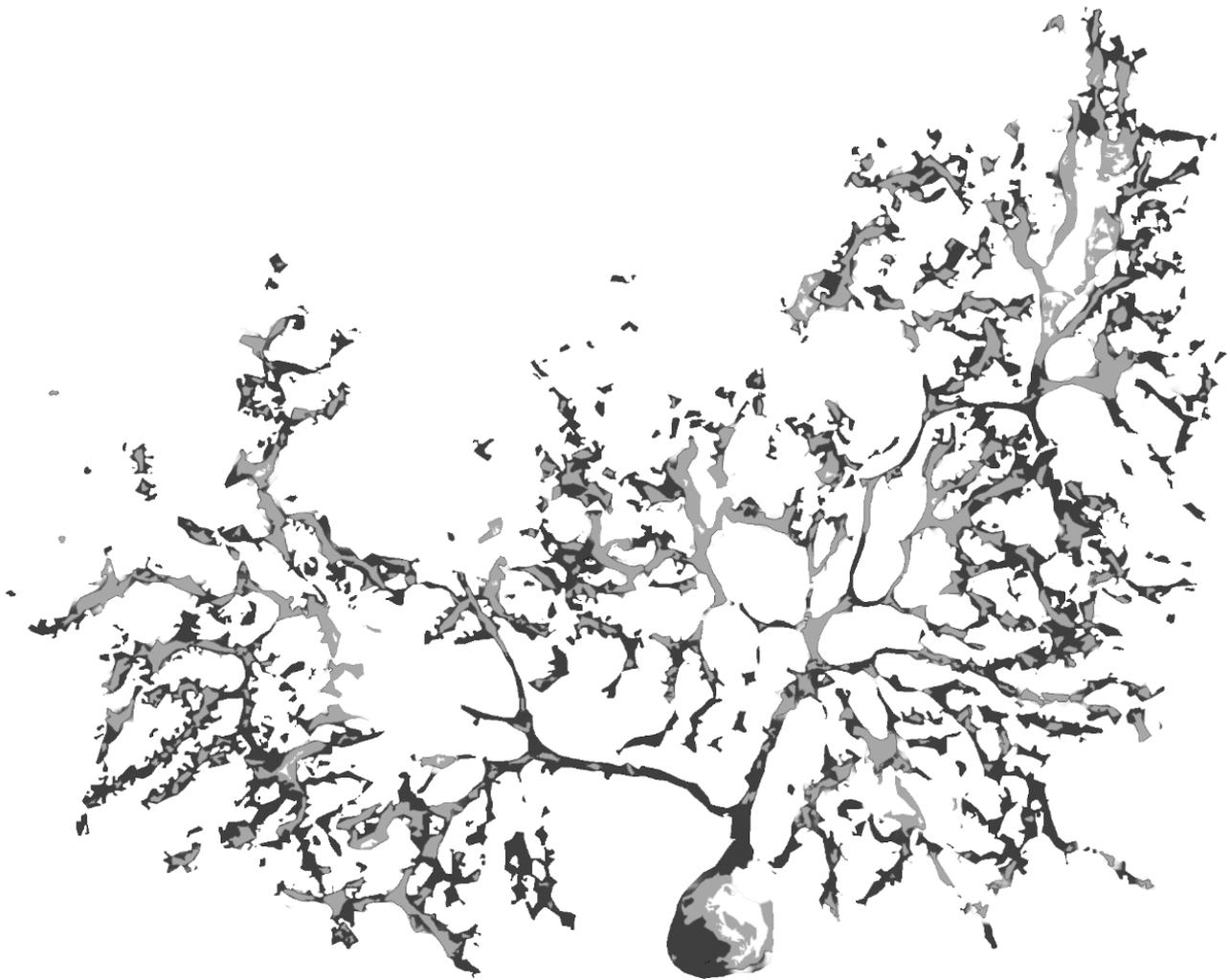
- gene expression. *Development*, 127(18), 3941-3946.
- Moisello, C., Bove, M., Huber, R., Abbruzzese, G., Battaglia, F., Tononi, G., y Ghilardi, M. F. (2008). Short-term limb immobilization affects motor performance. *J Mot Behav*, 40(2), 165-176.
- Mootha, V. K., Bunkenborg, J., Olsen, J. V., Hjerrild, M., Wisniewski, J. R., Stahl, E., Bolouri, M. S., Ray, H. N., Sihag, S., Kamal, M., Patterson, N., Lander, E. S., y Mann, M. (2003). Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell*, 115(5), 629-640.
- Morscher, R. J., Ducker, G. S., Li, S. H., Mayer, J. A., Gitai, Z., Sperl, W., y Rabinowitz, J. D. (2018). Mitochondrial translation requires folate-dependent tRNA methylation. *Nature*, 554(7690), 128-132.
- Morton, D. B., Jennings, M., Buckwell, A., Ewbank, R., Godfrey, C., Holgate, B., Inglis, I., James, R., Page, C., Sharman, I., Verschoyle, R., Westall, L., Wilson, A. B., y Joint Working Group on, R. (2001). Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim*, 35(1), 1-41.
- Motori, E., Atanassov, I., Kochan, S. M. V., Folz-Donahue, K., Sakthivelu, V., Giavalisco, P., Toni, N., Puyal, J., y Larsson, N. G. (2020). Neuronal metabolic rewiring promotes resilience to neurodegeneration caused by mitochondrial dysfunction. *Sci Adv*, 6(35), eaba8271.
- Moy, S. S., Nadler, J. J., Pérez, A., Barbaro, R. P., Johns, J. M., Magnuson, T. R., Piven, J., y Crawley, J. N. (2004). Sociability and preference for social novelty in five inbred strains: an approach to assess autistic-like behavior in mice. *Genes Brain Behav*, 3(5), 287-302.
- Mullen, R. J., Eicher, E. M., y Sidman, R. L. (1976). Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(1), 208-212.
- Muñoz-Castañeda, R. (2015). Plasticidad neural en el cerebelo: análisis del sistema endocannabinoide en el ratón PCD. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- Muñoz-Castañeda, R., Díaz, D., Peris, L., Andrieux, A., Bosc, C., Muñoz-Castañeda, J. M., Janke, C., Alonso, J. R., Moutin, M. J., y Weruaga, E. (2018). Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors. *Sci Rep*, 8(1), 3072.
- Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-de la Rosa, L., Cediell, R., Lassaletta, L., y Varela-Nieto, I. (2011). The role of insulin-like growth factor-I in the physiopathology of hearing. *Front Mol Neurosci*, 4, 11.
- Mysoet, J., Canu, M. H., Cieniewski-Bernard, C., Bastide, B., y Dupont, E. (2014). Hypoactivity affects IGF-1 level and PI3K/AKT signaling pathway in cerebral structures implied in motor control. *PLoS One*, 9(9), e107631.
- Mysoet, J., Dupont, E., Bastide, B., y Canu, M. H. (2015). Role of IGF-1 in cortical plasticity and functional deficit induced by sensorimotor restriction. *Behav Brain Res*, 290, 117-123.
- Nag, S., Eskandarian, M. R., Davis, J., y Eubanks, J. H. (2002). Differential expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) and VEGF-B after brain injury. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(9), 778-788.
- Nahm, S. S., Frank, T. C., Browning, M. D., Sepulvado, J. M., Hiney, J. K., y Abbott, L. C. (2003). Insulin-like growth factor-I improves cerebellar dysfunction but does not prevent cerebellar neurodegeneration in the calcium channel mutant mouse, leaner. *Neurobiol Dis*, 14(2), 157-165.
- Nieto-Bona, M. P., García-Segura, L. M., y Torres-Alemán, I. (1993). Orthograde transport and release of insulin-like growth factor I from the inferior olive to the cerebellum. *J Neurosci Res*, 36(5), 520-527.
- Nikkanen, J., Forsstrom, S., Euro, L., Paetau, I., Kohnz, R. A., Wang, L., Chilov, D., Viinamaki, J., Roivainen, A., Marjamaki, P., Liljenback, H., Ahola, S., Buzkova, J., Terzioglu, M., Khan, N. A., Pirnes-Karhu, S., Paetau, A., Lonqvist, T., Sajantila, A., ... y Suomalainen, A. (2016). Mitochondrial DNA Replication Defects Disturb Cellular dNTP Pools and Remodel One-Carbon Metabolism. *Cell Metab*, 23(4), 635-648.
- Nishijima, T., Piriz, J., Duflo, S., Fernández, A. M., Gaitan, G., Gómez-Pinedo, U., Verdugo, J. M., Leroy, F., Soya, H., Nunez, A., y Torres-Alemán, I. (2010). Neuronal activity drives localized blood-brain-barrier transport of serum insulin-like growth factor-I into the CNS. *Neuron*, 67(5), 834-846.
- Nishijima, T., Torres-Alemán, I., y Soya, H. (2016). Exercise and cerebrovascular plasticity. *Prog Brain Res*, 225, 243-268.
- O'Gorman, S. (1985). Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. II. Cytology of neuron loss. *J Comp Neurol*, 234(3), 298-316.

- O'Kusky, J., y Ye, P. (2012). Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Front Neuroendocrinol*, *33*(3), 230-251.
- Oishi, K., Watatani, K., Itoh, Y., Okano, H., Guillemot, F., Nakajima, K., y Gotoh, Y. (2009). Selective induction of neocortical GABAergic neurons by the PDK1-Akt pathway through activation of Mash1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(31), 13064-13069.
- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K., y Eriksson, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(6), 2576-2581.
- Olsson, A. K., Dimberg, A., Kreuger, J., y Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *7*(5), 359-371.
- Oosthuysen, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S., Theilmeier, G., Dewerchin, M., Laudénbach, V., Vermylen, P., Raat, H., Acker, T., Vleminckx, V., Van Den Bosch, L., Cashman, N., ... y Carmeliet, P. (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nat Genet*, *28*(2), 131-138.
- Park, H., y Poo, M. M. (2013). Neurotrophin regulation of neural circuit development and function. *Nat Rev Neurosci*, *14*(1), 7-23.
- Park, S. W., Nhu le, H., Cho, H. Y., Seo, M. K., Lee, C. H., Ly, N. N., Choi, C. M., Lee, B. J., Kim, G. M., Seol, W., Lee, J. G., y Kim, Y. H. (2016). p11 mediates the BDNF-protective effects in dendritic outgrowth and spine formation in B27-deprived primary hippocampal cells. *J Affect Disord*, *196*, 1-10.
- Pérez-Boyeró, D., Hernández-Pérez, C., Valero, J., Cabedo, V. L., Alonso, J. R., Díaz, D., y Weruaga, E. (2023). The eNOS isoform exhibits increased expression and activation in the main olfactory bulb of nNOS knock-out mice. *Front Cell Neurosci*, *17*, 1120836.
- Pérez-Martín, E. (2022). Terapia celular combinada con el fármaco neuroprotector N-oleiletanolamina en un modelo murino de degeneración neuronal selectiva. Tesis Doctoral, Universidad de Salamanca.
- Pérez-Martín, E., Muñoz-Castañeda, R., Moutin, M. J., Ávila-Zarza, C. A., Muñoz-Castañeda, J. M., del Pilar, C., Alonso, J. R., Andrieux, A., Díaz, D., y Weruaga, E. (2021). Oleylethanolamide Delays the Dysfunction and Death of Purkinje Cells and Ameliorates Behavioral Defects in a Mouse Model of Cerebellar Neurodegeneration. *Neurotherapeutics*, *18*(3), 1748-1767.
- Poesen, K., Lambrechts, D., Van Damme, P., Dhondt, J., Bender, F., Frank, N., Bogaert, E., Claes, B., Heylen, L., Verheyen, A., Raes, K., Tjwa, M., Eriksson, U., Shibuya, M., Nuydens, R., Van Den Bosch, L., Meert, T., D'Hooge, R., Sendtner, M., ... y Carmeliet, P. (2008). Novel role for vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-1 and its ligand VEGF-B in motor neuron degeneration. *J Neurosci*, *28*(42), 10451-10459.
- Popken, G. J., Dechert-Zeger, M., Ye, P., y D'Ercole, A. J. (2005). Brain development. *Adv Exp Med Biol*, *567*, 187-220.
- Puche, J. E., Muñoz, U., García-Magarino, M., Sadaba, M. C., y Castilla-Cortázar, I. (2016). Partial IGF-1 deficiency induces brain oxidative damage and edema, which are ameliorated by replacement therapy. *Biofactors*, *42*(1), 60-79.
- Rauskolb, S., Zagrebelsky, M., Dreznjak, A., Deogracias, R., Matsumoto, T., Wiese, S., Erne, B., Sendtner, M., Schaeren-Wiemers, N., Korte, M., y Barde, Y. A. (2010). Global deprivation of brain-derived neurotrophic factor in the CNS reveals an area-specific requirement for dendritic growth. *J Neurosci*, *30*(5), 1739-1749.
- Recio, J. S., Álvarez-Dolado, M., Díaz, D., Baltanás, F. C., Piquer-Gil, M., Alonso, J. R., y Weruaga, E. (2011). Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. *Cell Transplant*, *20*(8), 1179-1192.
- Recio, J. S., Weruaga, E., Gómez, C., Valero, J., Briñón, J. G., y Alonso, J. R. (2007). Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. *J Neurosci Res*, *85*(11), 2407-2421.
- Reeber, S. L., Otis, T. S., y Sillitoe, R. V. (2013). New roles for the cerebellum in health and disease. *Front Syst Neurosci*, *7*, 83.
- Rieker, C., Engblom, D., Kreiner, G., Domanskyi, A., Schober, A., Stotz, S., Neumann, M., Yuan, X., Grummt, I., Schutz, G., y Parlato, R. (2011). Nucleolar disruption in dopaminergic neurons leads to oxidative damage and parkinsonism through repression of mammalian target of rapamycin signaling. *J Neurosci*, *31*(2), 453-460.
- Rodríguez de la Vega Otazo, M., Lorenzo, J., Tort, O., Avilés, F. X., y Bautista, J. M. (2013). Functional segregation and emerging role of cilia-related cytosolic carboxypeptidases (CCPs). *FASEB J*, *27*(2), 424-431.
- Roffler-Tarlov, S., Landis, S. C., y Zigmond, M. J. (1984). Effects of Purkinje cell degeneration on the noradrenergic projection to mouse cerebellar cortex. *Brain Res*, *298*(2), 303-311.
- Rogowski, K., van Dijk, J., Magiera, M. M., Bosc, C., Deloulme, J. C., Bosson, A., Peris, L., Gold, N. D.,

- Lacroix, B., Bosch Grau, M., Bec, N., Larroque, C., Desagher, S., Holzer, M., Andrieux, A., Moutin, M. J., y Janke, C. (2010). A family of protein-deglutamylating enzymes associated with neurodegeneration. *Cell*, *143*(4), 564-578.
- Ronnebaum, S. M., Ilkayeva, O., Burgess, S. C., Joseph, J. W., Lu, D., Stevens, R. D., Becker, T. C., Sherry, A. D., Newgard, C. B., y Jensen, M. V. (2006). A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem*, *281*(41), 30593-30602.
- Rosenthal, A., Goeddel, D. V., Nguyen, T., Lewis, M., Shih, A., Laramée, G. R., Nikolics, K., y Winslow, J. W. (1990). Primary structure and biological activity of a novel human neurotrophic factor. *Neuron*, *4*(5), 767-773.
- Rowe, G. C., Jiang, A., y Arany, Z. (2010). PGC-1 coactivators in cardiac development and disease. *Circ Res*, *107*(7), 825-838.
- Russel V. M. S., y Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique. Methuen and Co., Londres.
- Ryabinin, A. E., Wang, Y. M., y Finn, D. A. (1999). Different levels of Fos immunoreactivity after repeated handling and injection stress in two inbred strains of mice. *Pharmacol Biochem Behav*, *63*(1), 143-151.
- Saatman, K. E., Contreras, P. C., Smith, D. H., Raghupathi, R., McDermott, K. L., Fernandez, S. C., Sanderson, K. L., Voddi, M., y McIntosh, T. K. (1997). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) improves both neurological motor and cognitive outcome following experimental brain injury. *Exp Neurol*, *147*(2), 418-427.
- Sanz-Gallego, I., Rodríguez-de-Rivera, F. J., Pulido, I., Torres-Alemán, I., y Arpa, J. (2014). IGF-1 in autosomal dominant cerebellar ataxia - open-label trial. *Cerebellum Ataxias*, *1*, 13.
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., y Hajnoczky, G. (2008). Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(52), 20728-20733.
- Sasi, M., Vignoli, B., Canossa, M., y Blum, R. (2017). Neurobiology of local and intercellular BDNF signaling. *PLoS Arch*, *4*(5-6), 593-610.
- Schönfeld, L. M., Dooley, D., Jahanshahi, A., Temel, Y., y Hendrix, S. (2017). Evaluating rodent motor functions: Which tests to choose? *Neurosci Biobehav Rev*, *83*, 298-312.
- Shashi, V., Magiera, M. M., Klein, D., Zaki, M., Schoch, K., Rudnik-Schoneborn, S., Norman, A., Lopes Abath Neto, O., Dusl, M., Yuan, X., Bartesaghi, L., De Marco, P., Alfares, A. A., Marom, R., Arold, S. T., Guzman-Vega, F. J., Pena, L. D., Smith, E. C., Steinlin, M., ... y Senderek, J. (2018). Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration. *EMBO J*, *37*(23), e100540.
- Sheffer, R., Gur, M., Brooks, R., Salah, S., Daana, M., Fraenkel, N., Eisenstein, E., Rabie, M., Nevo, Y., Jalas, C., Elpeleg, O., Edvardson, S., y Harel, T. (2019). Biallelic variants in AGTPBP1, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy. *Eur J Hum Genet*, *27*(9), 1419-1426.
- Shibuya, M., Yamaguchi, S., Yamane, A., Ikeda, T., Tojo, A., Matsushime, H., y Sato, M. (1990). Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (flt) closely related to the fms family. *Oncogene*, *5*(4), 519-524.
- Sillitoe, R. V., y Joyner, A. L. (2007). Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *23*, 549-577.
- Song, F., Liu, T., Meng, S., Li, F., Zhang, Y., y Jiang, L. (2018). Insulin-Like Growth Factor-1 Alleviates Expression of Abeta(1-40) and alpha-, beta-, and gamma-Secretases in the Cortex and Hippocampus of APP/PS1 Double Transgenic Mice. *J Mol Neurosci*, *66*(4), 595-603.
- Sousa, C., Biber, K., y Michelucci, A. (2017). Cellular and Molecular Characterization of Microglia: A Unique Immune Cell Population. *Front Immunol*, *8*, 198.
- Storkebaum, E., Lambrechts, D., y Carmeliet, P. (2004). VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays*, *26*(9), 943-954.
- Subhramanyam, C. S., Wang, C., Hu, Q., y Dheen, S. T. (2019). Microglia-mediated neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Semin Cell Dev Biol*, *94*, 112-120.
- Sullivan, A. M., y O'Keefe, G. W. (2016). Neurotrophic factor therapy for Parkinson's disease: past, present and future. *Neural Regen Res*, *11*(2), 205-207.
- Sun, Y., Jin, K., Childs, J. T., Xie, L., Mao, X. O., y Greenberg, D. A. (2004). Increased severity of cerebral ischemic injury in vascular endothelial growth factor-B-deficient mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, *24*(10), 1146-1152.
- Sun, Y., Jin, K., Childs, J. T., Xie, L., Mao, X. O., y Greenberg, D. A. (2006). Vascular endothelial growth factor-B (VEGFB) stimulates neurogenesis: evidence from knockout mice and growth factor administration. *Dev Biol*, *289*(2), 329-335.

- Suomalainen, A., y Battersby, B. J. (2018). Mitochondrial diseases: the contribution of organelle stress responses to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(2), 77-92.
- Supeno, N. E., Pati, S., Hadi, R. A., Ghani, A. R., Mustafa, Z., Abdullah, J. M., Idris, F. M., Han, X., y Jaafar, H. (2013). IGF-1 acts as controlling switch for long-term proliferation and maintenance of EGF/FGF-responsive striatal neural stem cells. *Int J Med Sci*, 10(5), 522-531.
- T**akahashi, H., y Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci (Lond)*, 109(3), 227-241.
- Tapia, O., Narcis, J. O., Riancho, J., Tarabal, O., Piedrafita, L., Caldero, J., Berciano, M. T., y Lafarga, M. (2017). Cellular bases of the RNA metabolism dysfunction in motor neurons of a murine model of spinal muscular atrophy: Role of Cajal bodies and the nucleolus. *Neurobiol Dis*, 108, 83-99.
- Terman, B. I., Carrión, M. E., Kovacs, E., Rasmussen, B. A., Eddy, R. L., y Shows, T. B. (1991). Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*, 6(9), 1677-1683.
- Torrado, J., y Carrascosa, C. (2003). Pharmacological characteristics of parenteral IGF-I administration. *Curr Pharm Biotechnol*, 4(2), 123-140.
- Torres-Alemán, I., Barrios, V., Lledo, A., y Berciano, J. (1996). The insulin-like growth factor I system in cerebellar degeneration. *Ann Neurol*, 39(3), 335-342.
- Triarhou, L. C., y Ghetti, B. (1991). Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged 'Purkinje cell degeneration' mutant mice. *Acta Neuropathol*, 81(6), 597-602.
- Triarhou, L. C., Norton, J., y Ghetti, B. (1987). Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. *Exp Brain Res*, 66(3), 577-588.
- Trinel, D., Picquet, F., Bastide, B., y Canu, M. H. (2013). Dendritic spine remodeling induced by hindlimb unloading in adult rat sensorimotor cortex. *Behav Brain Res*, 249, 1-7.
- Tsai, P. T., Hull, C., Chu, Y., Greene-Colozzi, E., Sadowski, A. R., Leech, J. M., Steinberg, J., Crawley, J. N., Regehr, W. G., y Sahin, M. (2012). Autistic-like behaviour and cerebellar dysfunction in Purkinje cell Tsc1 mutant mice. *Nature*, 488(7413), 647-651.
- Tuma, J., Kolinko, Y., Vozeh, F., y Cendelin, J. (2015). Mutation-related differences in exploratory, spatial, and depressive-like behavior in pcd and Lurcher cerebellar mutant mice. *Front Behav Neurosci*, 9, 116.
- U**tter, M. F., y Keech, D. B. (1963). Pyruvate Carboxylase. I. Nature of the Reaction. *J Biol Chem*, 238, 2603-2608.
- V**alero, J., Berciano, M. T., Weruaga, E., Lafarga, M., y Alonso, J. R. (2006). Pre-neurodegeneration of mitral cells in the pcd mutant mouse is associated with DNA damage, transcriptional repression, and reorganization of nuclear speckles and Cajal bodies. *Mol Cell Neurosci*, 33(3), 283-295.
- van der Heijden, M. E., Gill, J. S., y Sillitoe, R. V. (2021). Abnormal Cerebellar Development in Autism Spectrum Disorders. *Dev Neurosci*, 43(3-4), 181-190.
- Voogd, J., y Glickstein, M. (1998). The anatomy of the cerebellum. *Trends Neurosci*, 21(9), 370-375.
- Vožeh, F. (2015). Jan Evangelista Purkyne and the cerebellum then and now. *Physiol Res*, 64(Suppl 5), S567-584.
- W**aelsch, H., Berl, H. W., Rossi, C. A., Clarke, D. D., y Purpura, D. P. (1964). Quantitative Aspects of Co2 Fixation in Mammalian Brain in Vivo. *J Neurochem*, 11, 717-728.
- Wang, L., Chang, X., She, L., Xu, D., Huang, W., y Poo, M. M. (2015). Autocrine action of BDNF on dendrite development of adult-born hippocampal neurons. *J Neurosci*, 35(22), 8384-8393.
- Wang, T., y Morgan, J. I. (2007). The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration. *Brain Res*, 1140, 26-40.
- Wang, T., Parris, J., Li, L., y Morgan, J. I. (2006). The carboxypeptidase-like substrate-binding site in Nna1 is essential for the rescue of the Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *Mol Cell Neurosci*, 33(2), 200-213.
- Wang, X., Winter, D., Ashrafi, G., Schlehe, J., Wong, Y. L., Selkoe, D., Rice, S., Steen, J., LaVoie, M. J., y Schwarz, T. L. (2011). PINK1 and Parkin target Miro for phosphorylation and degradation to arrest mitochondrial motility. *Cell*, 147(4), 893-906.
- Wang, Y., Xu, E., Musich, P. R., y Lin, F. (2019). Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases and the potential countermeasure. *CNS Neurosci Ther*, 25(7), 816-824.
- Wassef, M., Simons, J., Tappaz, M. L., y Sotelo, C. (1986). Non-Purkinje cell GABAergic innervation of the deep cerebellar nuclei: a quantitative immunocytochemical study in C57BL and in

- Purkinje cell degeneration mutant mice. *Brain Res*, 399(1), 125-135.
- White, J. J., y Sillitoe, R. V. (2013). Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2(1), 149-164.
- Wilkins, H. M., Koppel, S., Carl, S. M., Ramanujan, S., Weidling, I., Michaelis, M. L., Michaelis, E. K., y Swerdlow, R. H. (2016). Oxaloacetate enhances neuronal cell bioenergetic fluxes and infrastructure. *J Neurochem*, 137(1), 76-87.
- Wu, Y., Wang, R., Wang, Y., Gao, J., Feng, L., y Yang, Z. (2019). Distinct Impacts of Fullerene on Cognitive Functions of Dementia vs. Non-dementia Mice. *Neurotox Res*, 36(4), 736-745.
- Xiu, Y., y Field, M. S. (2020). The Roles of Mitochondrial Folate Metabolism in Supporting Mitochondrial DNA Synthesis, Oxidative Phosphorylation, and Cellular Function. *Curr Dev Nutr*, 4(10), nzaa153.
- Yakar, S., y Adamo, M. L. (2012). Insulin-like growth factor 1 physiology: lessons from mouse models. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 41(2), 231-247.
- Yan, Q., Rosenfeld, R. D., Matheson, C. R., Hawkins, N., López, O. T., Bennett, L., y Welcher, A. A. (1997). Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience*, 78(2), 431-448.
- Yang, L., García Cañaveras, J. C., Chen, Z., Wang, L., Liang, L., Jang, C., Mayr, J. A., Zhang, Z., Ghergurovich, J. M., Zhan, L., Joshi, S., Hu, Z., McReynolds, M. R., Su, X., White, E., Morscher, R. J., y Rabinowitz, J. D. (2020). Serine Catabolism Feeds NADH when Respiration Is Impaired. *Cell Metab*, 31(4), 809-821 e806.
- Yao, D. L., Liu, X., Hudson, L. D., y Webster, H. D. (1995). Insulin-like growth factor I treatment reduces demyelination and up-regulates gene expression of myelin-related proteins in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(13), 6190-6194.
- Ye, P., Carson, J., y D'Ercole, A. J. (1995). Insulin-like growth factor-I influences the initiation of myelination: studies of the anterior commissure of transgenic mice. *Neurosci Lett*, 201(3), 235-238.
- Ye, P., Popken, G. J., Kemper, A., McCarthy, K., Popko, B., y D'Ercole, A. J. (2004). Astrocyte-specific overexpression of insulin-like growth factor-I promotes brain overgrowth and glial fibrillary acidic protein expression. *J Neurosci Res*, 78(4), 472-484.
- Yu, A. C., Drejer, J., Hertz, L., y Schousboe, A. (1983). Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J Neurochem*, 41(5), 1484-1487.
- Yue, X., Hariri, D. J., Caballero, B., Zhang, S., Bartlett, M. J., Kaut, O., Mount, D. W., Wullner, U., Sherman, S. J., y Falk, T. (2014). Comparative study of the neurotrophic effects elicited by VEGF-B and GDNF in preclinical in vivo models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 258, 385-400.
- Zeger, M., Popken, G., Zhang, J., Xuan, S., Lu, Q. R., Schwab, M. H., Nave, K. A., Rowitch, D., D'Ercole, A. J., y Ye, P. (2007). Insulin-like growth factor type 1 receptor signaling in the cells of oligodendrocyte lineage is required for normal in vivo oligodendrocyte development and myelination. *Glia*, 55(4), 400-411.
- Zhang, Q., Zhou, X., Li, Y., Yang, X., y Abbasi, Q. H. (2021). Clinical Recognition of Sensory Ataxia and Cerebellar Ataxia. *Front Hum Neurosci*, 15, 639871.
- Zhang, W., Ghetti, B., y Lee, W. H. (1997). Decreased IGF-I gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in pcd mice. *Brain Res Dev Brain Res*, 98(2), 164-176.
- Zhang, W., Lee, W. H., y Triarhou, L. C. (1996). Grafted cerebellar cells in a mouse model of hereditary ataxia express IGF-I system genes and partially restore behavioral function. *Nat Med*, 2(1), 65-71.
- Zhou, L., Hossain, M. I., Yamazaki, M., Abe, M., Natsume, R., Konno, K., Kageyama, S., Komatsu, M., Watanabe, M., Sakimura, K., y Takebayashi, H. (2018). Deletion of exons encoding carboxypeptidase domain of Nna1 results in Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. *J Neurochem*, 147(4), 557-572.
- Zuccato, C., y Cattaneo, E. (2009). Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*, 5(6), 311-322.



APÉNDICE | APPENDICE
SOLUCIONES DE USO COMÚN
COMMONLY USED SOLUTIONS

Fijador Somogyi | Somogyi fixative.

Compuesto por paraformaldehído 4 % (p/v) y ácido pícrico saturado al 15 % (v/v), tamponado en PB 0,1 M, pH 7,4.

Composed of 4 % (w/v) paraformaldehyde and 15 % (v/v) saturated picric acid in 0.1 PB, pH 7.4.

Medio de montaje para fluorescencia "antidevanecimiento" | Antifade mountin médium

Formado por glicerol al 70 % (v/v), n-propil galato al 5 % (p/v), glicina al 0,42 % (p/v) y azida al 0,003 % (p/v).

Made of 70 % (v/v) glycerol, 5 % (w/v) n-propyl gallate, 0.42 % (w/v) glycine and 0.003 azida.

Mezcla congeladora para secciones | Freezing mixture for sections

Constituida por glicerol al 30 % (v/v) y polietilenglicol al 30 % (v/v) tamponados con PB 0,1 M, pH 7,4.

Composed of 30 % (v/v) glycerol and 30 % (v/v) polyethylene glycol in 0.1 M PB, pH 7.4.

Solución crioprotectora de sacarosa | Sucrose solution for cryoprotection

Compuesta por sacarosa al 30 % (p/v) disuelta en PB 0,1 M, pH 7,4.

Composed of 30 % (w/v) sucrose dissolved in 0.1 PB, pH 7.4.

Solución para gelatinizar portaobjetos | Gelatin slide-coating solution.

Compuesta por gelatina en polvo al 0,45 % (p/v) y sulfato de potasio y cromo III dodecahidrato disueltos en H₂O Elix.

Made of 0.45 % (w/v) of powdered jelly and 0.044 % (w/v) of chromium III potassium sulfate·12H₂O dissolved in H₂O Elix.

Solución salina isotónica | Isotonic saline solution.

Se compone de NaCl al 0,9 % (p/v) en H₂O Elix.

Composed of 0.9 % (w/v) NaCl dissolved in H₂O Elix.

Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 | Phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4.

Se obtiene mezclando soluciones 0,2 M de Na₂HPO₄·12H₂O y NaH₂PO₄·2H₂O. Para un volumen de dos litros, se disuelven 107,4 g de Na₂HPO₄·12H₂O en 1500 ml de H₂O Elix y 15,6 g de NaH₂PO₄·2H₂O en 500 ml de H₂O Elix. Mezclar hasta el pH deseado de 7,4.

Obtained by mixing 0.2 M Na₂HPO₄·12H₂O and NaH₂PO₄·2H₂O. For 2 liters, dissolve 107.4 g Na₂HPO₄·12H₂O in 1500 ml Elix H₂O and 15.6 g NaH₂PO₄·2H₂O in 500 ml Elix H₂O. Mix until pH 7.4.

Tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 | Phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4.

Se prepara diluyendo la solución de Tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4 a la mitad en H₂O Elix.

Prepared by diluting Phosphate buffer 0.2 M, pH 7.4 by half (1:1) in Elix H₂O.

Tampón fosfato salino, pH 7,4 | Phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4.

Para obtener un litro de la solución se disuelven los siguientes componentes en H₂O Elix: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 3.63 g de Na₂HPO₄·12H₂O y 0,21 g de KH₂PO₄. Se ajusta el pH a 7,4.

For 1 liter, the following chemicals are dissolved in Elix H₂O: 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 3.63 g Na₂HPO₄·12H₂O and 0.21 g KH₂PO₄. pH is adjusted to 7.4.

Tampón BSA 3 % | BSA buffer 3 %

Para preparar 500 ml se añade 15 g BSA a 500 ml de PBS 1X.

For 500 ml mix 15 g BSA in 500 ml PBS 1X.

Tampón Tris -EDTA para recuperación antigénica | Tris-EDTA buffer for antigen recovery.

Para preparar un litro, se disuelven 1,21 g de Trizma base 10 mM y 0,37 g de EDTA 1 mM, pH 9,0 en 1000 ml de H₂O Elix. A continuación, añadir 0,5 ml de Tween 20.

For 1 liter, dissolve 1.21 g Trizma base 10 mM and 0.37 g EDTA 1 mM, pH 9.0 in 1000 ml Elix H₂O. Then, add 0,5 ml Tween 20.

Solución de citrato sódico 1 M | Sodium citrate solution 1 M

Se obtiene disolviendo 29,4 g de citrato trisódico dihidrato en 100 ml de H₂O Elix.

Prepared by diluting 29.4 g trisodium citrate dihydrate in 100 ml Elix H₂O.

Tampón SSC 20X, pH 7,0 | SSC buffer 20X, pH 7.0

Para preparar 50 ml se mezcla 8,77g de NaCl 3 M con 4,41 g de citrato trisódico dihidrato 0,3 M en 30 ml de H₂O Elix. Se ajusta el pH a 7,0 y se enrasa con H₂O hasta los 50 ml.

For 50 ml, dissolve 8.77 g NaCl 3 M and 4.41 g trisodium citrate dihydrate 0.3 M in 30 ml Elix H₂O. pH is adjusted to 7.4 and make up to 50 ml with H₂O.

Tampón TUNEL, pH 7,2 | TUNEL buffer, pH 7.2

Para obtener 100 ml se mezclan 15 ml de una solución de Tris-HCl 0,2 M, pH 7,2, 2,997 g de cacodilato de sodio, 23,793 mg de cloruro de cobalto y 1,5 ml de Tritón X-100 al 20 % (v/v). Por último, se ajusta el volumen hasta 100 ml con H₂O Elix.

For 100 ml, mix 15 ml of a solution of Tris-HCl 0.2 M, pH 7.2, 2.997 g sodium cacodylate, 23.793 mg cobalt chloride and 1.5 ml Triton X-100 20 % (v/v). Finally, make up to 100 ml with H₂O.

