VNiVERSiDAD
Đ SALAMANCA

ESTUDIO DE LA PRE-NEURODEGENERACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE EN UN MODELO DE ATAXIA CEREBELOSA: EL RATÓN MUTANTE PCD

-TESIS DOCTORAL-

FERNANDO CALVO BALTANÁS

Salamanca, julio 2009

VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELVLAR Y PATOLOGÍA
INSTITVTO DE NEVROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

ESTUDIO DE LA PRE-NEURODEGENERACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE EN UN MODELO DE ATAXIA CEREBELOSA: EL RATÓN MUTANTE PCD

Memoria presentada por *Fernando Calvo Baltanás* para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca

Directores:

Prof. Dr. D. José Ramón Alonso Peña

Prof. Dr. D. Eduardo Weruaga Prieto

Julio 2009

VNiVERSiDAD
D SALAMANCA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA CELVLAR Y PATOLOGÍA
INSTITVTO DE NEVROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN

ESTUDIO DE LA PRE-NEURODEGENERACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE PURKINJE EN UN MODELO DE ATAXIA CEREBELOSA: EL RATÓN MUTANTE PCD

Fernando Calvo Baltanás

Julio 2009

A mis padres

A mis hermanas

A Marta

La ignorancia afirma o niega rotundamente;

la ciencia duda.

Voltaire (1694-1778)

Agradecimientos

Es difícil resumir en apenas un folio el agradecimiento que quiero expresar a todas aquellas personas que de una u otra manera me han ayudado durante todo este tiempo. Aún así, lo intentaré.

En primer lugar a los directores de esta Tesis Doctoral, el Dr. José Ramón Alonso Peña y el Dr. Eduardo Weruaga Prieto. Espero haber estado a la altura de lo que esperabais de mí. Gracias por vuestra confianza y ayuda durante todos estos años. Gracias a todos los miembros del Departamento de Biología Celular y Patología de la Universidad de Salamanca: profesores, técnicos y becarios; habéis sido grandes consejeros, compañeros y amigos. Quiero hacer especial mención a los que habéis participado de forma activa en la elaboración de esta Tesis: Elena, María, Gloria, Maite, David, Javi y Jorge. Me siento afortunado de haber trabajado a vuestro lado durante todo este tiempo. ¡Muchas gracias!

A todos los miembros del Instituto de Neurociencia de Castilla y León, especialmente a la Dra. Tabernero y al Dr. Medina por su ayuda.

A los Drs. Miguel Lafarga y Mª. Teresa Berciano de la Universidad de Cantabria y a su maravilloso grupo: Íñigo, Olga, Rocío, Saray y Laura. Por su gran calidad humana e investigadora, por hacerme sentir uno más, por enseñarme tanto. Ha sido un privilegio y un placer poder trabajar y aprender a vuestro lado. Siempre os estaré agradecido.

Al Dr. Carlos Crespo (Universidad de Valencia) y al Dr. Richard Hawkes (Universidad de Calgary, Canadá) por la cesión de los anticuerpos contra la 3-nitrotirosina y Zebrin II, respectivamente.

A mis amigos "botijeros", Álvaro, Ángel, César, David, Raúl y Rober, por estar siempre cuando se necesitan, por aguantar mis rarezas y últimamente mis numerosas ausencias. También a los "mayorganos"por aceptarme y hacerme sentir tan a gusto con ellos. A Soraya por su amistad en la distancia, ¡enhorabuena de nuevo mamá!

A Marta, por ser mi compañera y amiga. Juntos hemos superado adversidades, pero mucho más numerosos son los buenos momentos que hemos pasado ¿Sabes lo mejor de todo? Esto es sólo el comienzo. Gracias por hacerme tan feliz. Te quiero pequeña. Quiero aprovechar estas líneas para agradecer a Ignacio, "Feli", Victoria, Óscar, Irene y Pedro el cariño que siempre me han dado.

A mis hermanas, Rocío y Vanesa. Gracias por vuestro cariño, por preocuparos por mí, por vuestros ánimos. Tengo muchísima suerte de que forméis parte de mi vida.

Finalmente, a mis padres. A vosotros os debo todo. Gracias por educarme cómo lo habéis hecho, por siempre pensar en vuestros hijos, por querernos tanto, Nunca os podré agradecer lo suficiente todo lo que me habéis dado. Soy una persona muy afortunada, espero que algún día os sintáis igual de orgullosos de mí como yo lo estoy de vosotros, sois los mejores padres que se puede tener. Os quiero.

¡Muchas gracias a todos!

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido financiado por la Junta de Castilla y León, el Centro en Red de Medicina Regenerativa y Terapia Celular de Castilla y León, la Federación de Cajas de Ahorros de Castilla y León, el Ministerio de Ecuación y Ciencia (SAF 2006-05705), el Ministerio de Sanidad y consumo (PNSD SA002A07), la Fundación de Investigación Médica Mutua Madrileña Automovilística.

ÍNDICE

Índice 1

Abreviaturas 7

Introducción 11

El cerebelo 14

Estructura y tipos neurales 14
Desarrollo del cerebelo 18
Conexiones 19

Las células de Purkinje 21

Características estructurales 21
Desarrollo 21

El ratón mutante PCD 22

La mutación pcd 23
El gen *nna1* 24
Efectos de la mutación pcd 26
Efecto de la mutación pcd en el cerebelo 27
Alteraciones neuropatológicas *27*
Glía y neurodegeneración *28*
Alteraciones ultraestructurales de las células de Purkinje del ratón PCD *29*
Alteraciones sinápticas de las células de Purkinje del ratón PCD *30*
Alteraciones neuroquímicas *30*

Compartimentos nucleares 31

Los territorios cromosómicos 32
Las regiones intercromatínicas 34
El nucleolo 35
Las fibrillas pericromatínicas 37
Los agregados de granulaciones intercromatínicas 38
El cuerpo de Cajal 38

Mecanismos de señalización de daño y reparación del ADN 40

Justificación y Objetivos 45

Material y Métodos 49

Animal de experimentación 52

Genotipado de los animales 52
Extracción de ADN 53
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) 53
Electroforesis *54*

Técnicas de Biología Molecular 54

Hibridación de Microarrays 54
Extracción del ARN total 55
Análisis de la expresión génica 55
Análisis estadístico 55
PCR a tiempo real 56
Retrotranscripción 56
PCR cuantitativa en tiempo real 57
Cuantificación de los datos 59
Desarrollo del anticuerpo contra la proteína Nna1 61
Elección de los péptidos 61
Síntesis del péptido e inmunización 62
Western-blot 62
Extracción y valoración de proteínas 62

Preparación de los geles de SDS-poliacrilamida ... 63
Electroforesis ... 63
Inmunodetección ... 64
Técnicas de análisis histológico ... 64
Obtención y seccionamiento del tejido ... 64
Técnica inmunohistoquímica en tejido ... 65
Controles de las técnicas de inmunohistoquímica ... 65
Inclusión en parafina ... 66
Técnica inmunohistoquímica en parafina ... 66
Disociado de neuronas ... 67
Inmunofluorescencia en disociados neuronales ... 68
Análsisis estadístico ... 68
TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labelling) ... 69
En tejido ... 69
En disociados neuronales ... 69
Microscopía electrónica ... 69
Inclusión en Araldita ... 69
Inclusión en Lowicryl ... 70
Técnica inmunocitoquímica ... 71
Hibridación in situ de ADN telomérico ... 71
Hibridación in situ de la cadena de Poli(A) ... 72
Técnica de análisis de comportamiento ... 73
Prueba de la barra giratoria (Rota-rod) ... 73
Resultados ... 75
Degeneración de las células de Purkinje ... 77
Pre-neurodegeneración de las células de Purkinje ... 77
Análisis de la capacidad motora del ratón PCD ... 77
Citología de las células de Purkinje del ratón PCD ... 78
Análisis del núcleo celular ... 78
Territorios cromosómicos ... 79
ADN telomérico ... 79
Estado general de la cromatina: daño y reparación ... 79
Heterocromatinización de la célula de Purkinje ... 81
Dominios intercromatínicos ... 81
Localización del ARNm ... 81
El nucleolo ... 82
El cuerpo de Cajal ... 82
Degradación proteica: el proteasoma ... 83
Activación de la glía en el ratón mutante PCD ... 84
La microglía en el cerebelo ... 84
La astroglía en el cerebelo ... 87
La oligodendroglía en el cerebelo ... 87
La glía en el bulbo olfatorio ... 88
Estudio del nivel de expresión del gen nna1 ... 89
Estudio de las tubulinas en el cerebelo ... 90
Estudio de la expresión de la β-tubulina ... 90
Estudio de la expresión de la α-tubulina ... 90
Expresión de α-tubulina tirosinada ... 91
Expresión de α-tubulina destirosinada ... 91
Expresión de Δ-tubulina ... 91
Anticuerpo contra Nna1 ... 92
Iconografía ... 93

Figuras 16-47 95

Discusión 157

Pre-degeneración y degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo del ratón PCD 159

Alteraciones de la célula de Purkinje 160
Alteraciones citoplasmáticas 161
Alteraciones dendríticas 161
Alteraciones axonales 162
Alteraciones nucleares 162
Alteraciones en la cromatina 162
Alteración del ADN telomérico 162
Las CP del ratón PCD presenta focos de lesión del ADN 163
Silenciamiento génico de las CP del ratón PCD 165
Alteraciones del nucleolo 166
Alteraciones del cuerpo de Cajal 166
Activación de la vía del proteasoma en las CP del ratón PCD 167
Activación y función de la glía. Consecuencias en el ratón mutante PCD 167
Activación de la microglía en el cerebelo del ratón PCD 168
Activación de la astroglía en el cerebelo del ratón PCD 170
Estado de la oligodendroglía en el cerebelo del ratón PCD 170
¿La gliosis reactiva acelera la degeneración de las células de Purkinje? 171
Activación de la glía en el bulbo olfatorio 173
¿Influye la gliosis en los patrones temporales de muerte neuronal del ratón PCD? 176
Funciones de la proteína Nna1 en la modificación postraduccional de la α-tubulina 177
La proteína Nna1 es una metalocarboxipeptidasa 177
¿Es la tubulina carboxipeptidasa la proteína codificada por el gen *nna1* y la α-tubulina su sustrato? 178
Evidencias a favor 179
Evidencias en contra 180

Conclusiones 183

Apéndice 187

Soluciones de uso común 189

Sueros inmunológicos 190

Anticuerpos primarios 190
Anticuerpos secundarios 191

Bibliografía 193

ABREVIATURAS

53BP1: proteína 1 de unión a p53
ADN: ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
ADNr: ADN ribosómico
APS: persulfato de amonio (del inglés: *Ammonium PerSulfate*)
ARN: ácido ribonucleico
ARNhn: ARN heterogéneo nuclear
ARNm: ARN mensajero
ARNsca: ARN pequeños del cuerpo de Cajal (del inglés: *Small Cajal Bodies*)
ARNsn: ácido ribonucleico pequeño nuclear (del inglés: *Small Nuclear*)
ARNt: ARN de transferencia
ATM: proteína mutada en la ataxia telangiectasia (del inglés: *Ataxia Telangiectasia Mutated protein*)
BO: bulbo olfatorio
BSA: seroalbúmina bovina (del inglés: *Bovine Serum Albumin*)
CB: calbindina D-28k
CC: cuerpo de Cajal
CCM: capa de las células mitrales
CCP: capa de las células de Purkinje
CG: capa de los granos
CGl: capa glomerular
CM: capa molecular
CP: células de Purkinje
CPE: capa plexiforme externa
CPI: capa plexiforme interna
DAB: 3,3'-diaminobencidina
DEPC: dietilpirocarbonato
EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético (del inglés: *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*)
FITC: isotiocianato de fluoresceína (del inglés: *Fluorescein Isothiocyanate*)
GFAP: proteína ácida fibrilar glial (del inglés: *Glial Fibrillary Acidic Protein*)
Glu-Tub: forma destirosinada de la α-tubulina
H2AX: variante de la histona H2
γ-H2AX: forma fosforilada de la H2AX
H4-K20-3Me: histona H4 trimetilada en la lisina 20
iNOS: isoforma inducible de la óxido nítrico sintasa (del inglés: *inducible Nitric Oxide Synthase*)
IP: ioduro de propidio
MBP: proteína básica de mielina (del inglés: *Myelin Basic Protein*)
MP: marcador de peso molecular
***nna1*:** gen que codifica la proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía (del inglés: *Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy*)
Nna1: proteína codificada por el gen *nna1*
pATM: ATM fosforilada (del inglés: *phosphorylated ATM*)
pb: pares de bases

pcd: mutación que produce degeneración de las células de Purkinje (del inglés: *Purkinje Cell Degeneration*)
PCD: ratón homocigoto para la mutación pcd
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés: *Polymerase Chain Reaction*)
RT-PCR: PCR a tiempo real (del inglés: *Real Time*)
PFA: paraformaldehído
Pm: peso molecular
RER: retículo endoplasmático rugoso
RNPs: ribonucleoproteínas
RNPsn: RNPs pequeñas nucleares
RNPsno: RNPs pequeñas nucleolares
RON: región organizadores nucleolares
RPA: (del inglés: *Replication Protein A*)
rpm: revoluciones por minuto
SDS: dodecil Sulfato Sódico (del inglés: *Sodium Dodecyl Sulphate*)
SB: sustancia blanca
SSC: tampón citrato sódico salino (del inglés: *Sodium Chloride-Sodium Citrate*)
SSR: repetición de secuencias discretas (del inglés: *Short Sequence Repeat*)
TA: temperatura ambiente
TBE: tampón Tris-Borato-EDTA
TEMED: N,N,N',N'-TEtraMetilEtilDiamina
TF: tampón fosfato
TFS: TF salino
TTL: tubulina tirosina ligasa
TubCP: tubulina carboxipeptidasa
Tuj1: marcador neuronal β-tubulina III
TUNEL: marcaje de extremos mellados con dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal (del inglés: *Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labelling*)
Tyr-Tub: forma tirosinada de la α-tubulina.

Introducción

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo de disfunciones del Sistema Nervioso, cuya etiología es en la mayoría de los casos desconocida y con un curso progresivo de los síntomas que genera un alto coste personal, económico y social. Las respuestas terapéuticas actuales son sintomáticas en algunos casos y paliativas en todos ellos. En la actualidad, el estudio de estas enfermedades se ha situado a la vanguardia de la actividad investigadora a nivel mundial. Ello es debido a las repercusiones socioeconómicas que generan, pues al propio proceso de la enfermedad hay que sumar el impacto psíquico, la pérdida de calidad de vida, la carga física y psicológica de sus cuidadores y el enorme gasto económico que conlleva la atención social y sanitaria de todas estas personas.

La mayoría de estudios sobre la etiología y curso de estas patologías analizan la respuesta plástica que ocurre en el sistema nervioso afectado ante el daño en un área cerebral, un núcleo o, incluso, la ausencia de un determinado tipo neuronal. Sin embargo, apenas se presta atención a aquellos procesos que tienen lugar en las neuronas afectadas en las etapas previas a su muerte. El conocimiento más profundo de estos eventos patológicos iniciales podría suponer un avance en el desarrollo de nuevas terapias preventivas ante la muerte neuronal, así como en su diagnosis. El objetivo del presente trabajo de Tesis Doctoral es analizar las distintas alteraciones que suceden en la célula afectada de neurodegeneración, centrándonos en una etapa anterior a su muerte, que denominamos **pre-neurodegeneración**. Para ello utilizaremos el ratón mutante PCD, un modelo de ataxia cerebelosa que sufre la pérdida de las células de Purkinje del cerebelo.

Comenzaremos la Introducción de esta Tesis Doctoral describiendo la neuroanatomía del cerebelo, detallaremos los tipos celulares que conforman esta estructura, cómo es su desarrollo embriológico y las conexiones sinápticas que ocurren en él. A continuación, analizaremos en profundidad las características de la neurona más representativa del cerebelo y que es el eje central de este trabajo de Tesis Doctoral, la célula de Purkinje. Posteriormente, resumiremos las características del modelo experimental de neurodegeneración que vamos a emplear, el ratón mutante PCD (del inglés ***P**urkinje **C**ell **D**egeneration*). Describiremos la mutación pcd, sus efectos generales y, más concretamente, sus efectos en el cerebelo, señalando la importancia y utilidad de este modelo para este trabajo. A continuación haremos una breve revisión sobre los compartimentos nucleares y las vías de señalización/reparación de las lesiones en el ADN para plantear los mecanismos que pueden estar involucrados en el proceso degenerativo de las células de Purkinje. Concluiremos el apartado de Introducción con la justificación y objetivos de esta Tesis Doctoral.

El cerebelo

Estructura y tipos neurales

El cerebelo (del latín cerebellum: cerebro pequeño) es una estructura del sistema nervioso central localizado en la parte más caudal del encéfalo en los roedores (Fig. 1). Esta región ha sido concebida tradicionalmente como una estructura motora implicada en la regulación del movimiento más que en su ejecución. Además, el cerebelo regula el tono muscular, controla el equilibrio estático y dinámico, y participa en procesos de aprendizaje motor (Sotelo, 2004; Ito, 2006).

El cerebelo es una de las regiones encefálicas mejor estudiadas debido a la sencilla organización laminar de su corteza y a que se dispone de un buen conocimiento de su citología y arquitectura sináptica (Ramón y Cajal, 1911; Palay y Chan-Palay, 1974; Voogd et al., 1985). La característica morfológica más reseñable es el patrón de circunvoluciones transversales de la superficie y las fisuras que dividen esta estructura en lóbulos y lobulillos. La organización externa del cerebelo muestra una región central llamada *vermis*, flanqueada por regiones laterales conocidas como *hemisferios*. La parte medial de los hemisferios que está en contacto con el vermis se conoce como *zona intermedia* (Fig. 2). En su superficie, el cerebelo presenta surcos conocidos como fisuras, que dividen la corteza cerebelosa en lóbulos (Sillitoe y Joyner, 2007). De hecho, se distinguen 10 lóbulos, numerados del 1 al 10, aunque esta división puede ser más compleja entre distintas estirpes de ratón (Fig. 2; Sillitoe y Joyner, 2007).

Figura 1. Encéfalo del ratón. Vista panorámica del encéfalo del ratón. El cerebelo se localiza en la parte más caudal del encéfalo del ratón (flecha).

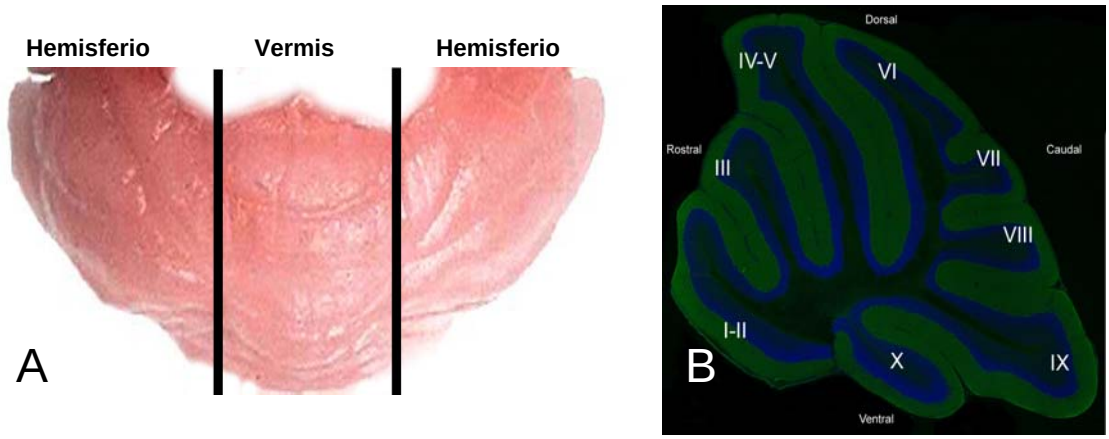

Figura 2. (A) Cerebelo del ratón. La zona central del cerebelo se conoce como vermis, mientras que las regiones laterales son los hemisferios. La parte medial de los hemisferios que está en contacto con el vermis se conoce como *zona intermedia* (líneas negras). (B) Sección sagital del vermis. Se pueden distinguir los 10 lóbulos cerebelosos.

El cerebelo consta de dos partes bien diferenciadas, los núcleos cerebelosos profundos y la corteza cerebelosa. A pesar de la compleja morfología que presenta el cerebelo, la corteza cerebelosa es histológicamente homogénea y está dividida en tres capas bien diferenciadas que rodean un núcleo formado por sustancia blanca (SB) y tres pares de grupos simétricos de núcleos cerebelosos profundos.

Las tres capas de la corteza cerebelosa resultan de la disposición que adquieren las neuronas más representativas del cerebelo, las células de Purkinje (CP). La CP es la neurona más representativa del cerebelo. Los somas de estas neuronas se disponen en forma de monocapa, constituyendo así la **capa de las células de Purkinje** (CCP). Por debajo de esta capa se sitúa la **capa de los granos** (CG). El nombre de esta capa se debe a que en ella se localiza el tipo neuronal más numeroso del encéfalo, los granos cerebelosos. Por último, por fuera de la CCP está la **capa molecular** (CM). La CM está principalmente constituida por neuropilo, aunque también aparecen algunos tipos neurales. Aquí llegan las fibras trepadoras, se extiende el árbol dendrítico de las CP, y los axones de los granos ascienden desde la CG para contactar con las dendritas de las CP (Fig. 3).

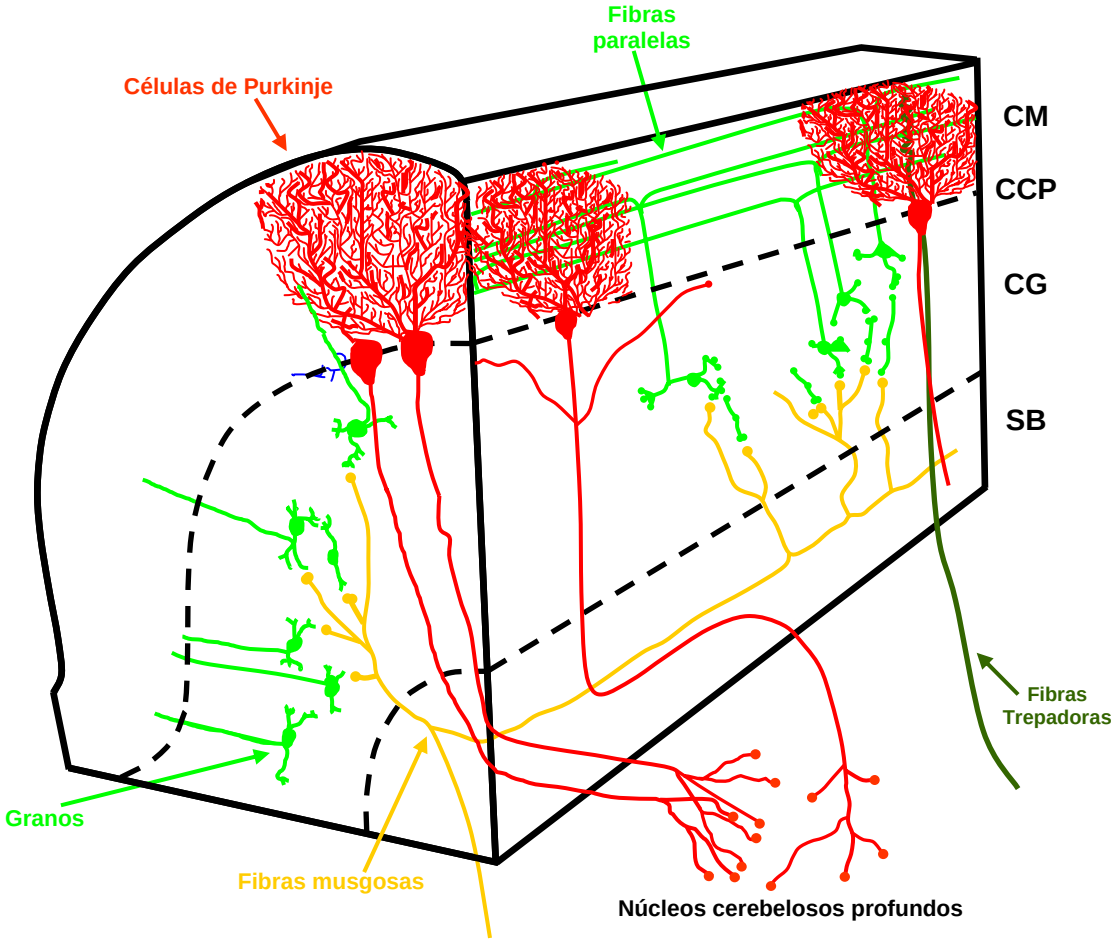

Figura 3. **Esquema tridimensional de la corteza cerebelosa**. En el esquema se representan los elementos principales de cada una de las capas que constituyen la corteza cerebelosa. La **CM** está formada mayoritariamente por neuropilo; en concreto, por los axones de los granos, las dendritas de las CP y las fibras trepadoras. La **CCP** está formada por los somas de las CP. La **CG** contiene los somas de los granos, que son las neuronas más numerosas del cerebelo. Modificado de Recio, 2008.

Aunque éstos son los elementos más representativos de cada una de las capas de la corteza cerebelosa, la histología de esta parte del cerebelo es mucho más compleja, como a continuación vamos a describir (Fig. 4).

La capa más superficial del cerebelo es la **CM**. Esta región está constituida por las dendritas de las CP, de las células de Golgi y de las células en candelabro, además de las fibras en empalizada de la glía de Bergmann, las fibras trepadoras y los axones de los granos, que se bifurcan constituyendo las fibras paralelas (Fig. 4; Sillitoe y Joyner, 2007). En la CM también encontramos los somas de dos tipos de interneuronas inhibitorias, las células estrelladas y las células en cesto (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007). En esta capa también se encuentran dispersos elementos no neuronales, como células de microglía residente y escasos oligodendrocitos. La siguiente capa es la conocida como **CCP**. Es una fina monocapa compuesta principalmente por los somas de las neuronas más representativas del cerebelo, las células de Purkinje (CP). Además, aquí también se encuentran los somas de un tipo especial de glía, la glía de Bergmann (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007). Inmediatamente por debajo de la CCP se sitúa la **CG**, donde se localizan los granos del cerebelo, el tipo neuronal más numeroso del encéfalo. Los somas de otros tipos de interneuronas como las *células de Golgi*, las *células de Lugaro*, las *neuronas perivasculares*, las *células en*

candelabro y las *neuronas sinarmóticas*, también residen en la capa granular del cerebelo (Fig. 4; Lainé y Axerald, 1994; Mugnaini et al., 1997; Ambrosi et al., 2007). También se pueden encontrar en la CG los somas de las células unipolares en cepillo, aunque éstas se localizan mayoritariamente en la CG de la zona nodular del cerebelo (Diño et al., 1999) y las fibras musgosas.

La capa más interna es la **SB**: está formada por una masa voluminosa central, denominada cuerpo o centro medular, de la que parten prolongaciones axónicas hacia las circunvoluciones del cerebelo. Desde el punto de vista histológico, la SB está formada por axones además de astrocitos fibrosos, microglía residente y abundantes oligodendrocitos productores de mielina. Los axones de la SB son tanto fibras eferentes y aferentes como axones intrínsecos que conectan diferentes áreas corticales entre sí.

En el interior de la SB podemos encontrar los núcleos cerebelosos profundos. Esta estructura la constituyen tres pares de núcleos de sustancia gris, que desde la zona medial a la lateral son: el **núcleo fastigial**, el **núcleo interpuesto** y el **núcleo dentado**. No hay conexiones directas de la corteza cerebelosa con el exterior del cerebelo, excepto por algunos axones que alcanzan directamente los núcleos vestibulares (Ito, 2006, 2008).

Además de esta división morfológica, la corteza cerebelosa se subdivide, tanto mediolateral como rostrocaudalmente, en columnas bien diferenciadas por la ausencia o presencia de marcadores moleculares específicos (Hawkes y Mascher, 1994), por la distribución de conexiones aferentes que llegan al cerebelo (Hawkes, 1992; Voogd y Glickstein, 1998) o por estudios funcionales (Welker, 1990). Por ejemplo, la expresión diferencial de ciertos genes divide la corteza rostrocaudalmente en cuatro zonas transversales: la **zona anterior** (engloba los lóbulos I-V), la **zona central** (VI-VII), la **zona posterior** (VIII y parte dorsal del IX) y la **zona nodular** (parte ventral del IX y X). Además, estas regiones se pueden subdividir mediolateralmente en franjas parasagitales bien definidas y que se caracterizan por la expresión de marcadores como la acetilcolinesterasa (Tan et al., 1995), la 5'-nucleotidasa (Marani et al., 1977), el marcador Zebrin II (Hawkes y Eisenman, 1997) o la chaperona Hsp25 (Armstrong et al., 2000, 2001).

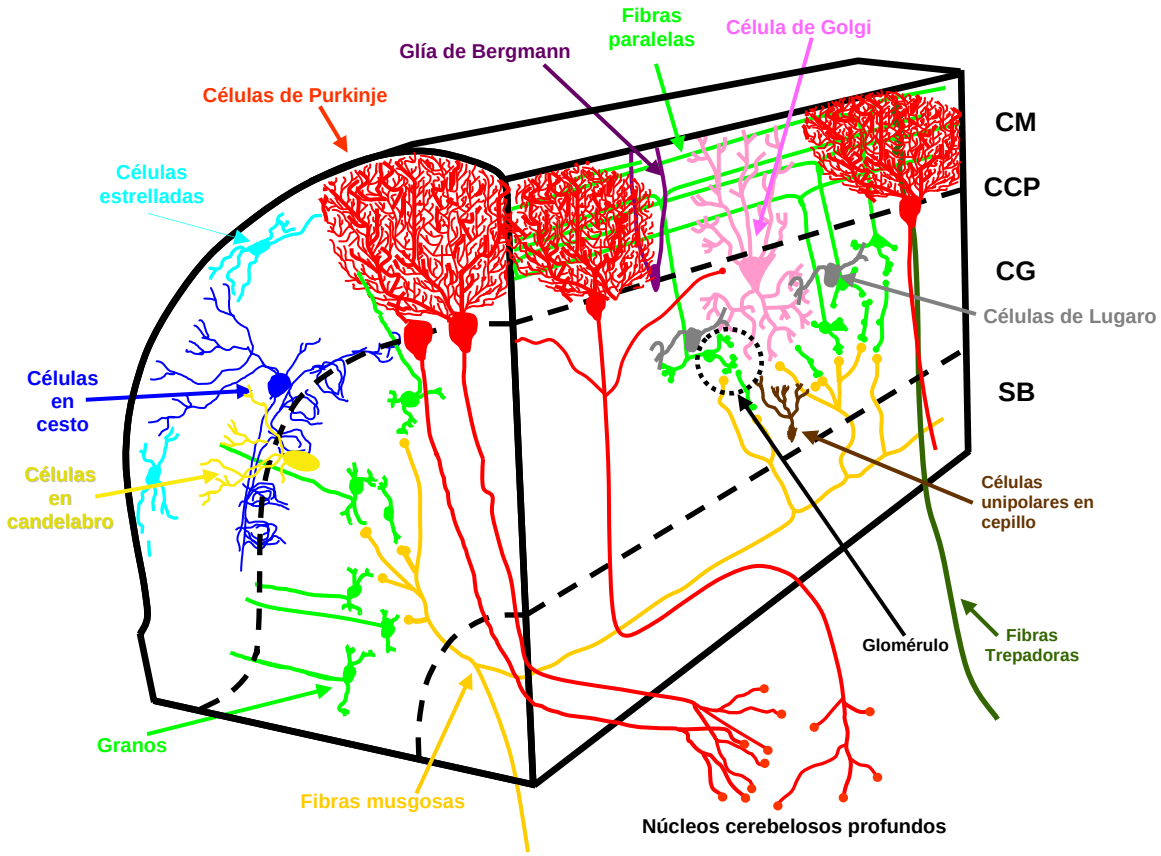

Figura 4. **Esquema tridimensional de la corteza cerebelosa**. En el esquema se pueden observar los principales elementos neurales, situados en las capas que constituyen la corteza cerebelosa. La **CM** esta constituida por los somas de las células estrelladas y las células en cesto, además de los axones de los granos (fibras paralelas), las dendritas de las CP, las células de Golgi y las células en candelabro, las fibras en empalizada de la glía de Bergmann y las fibras trepadoras. La **CCP** está formada por los somas de las CP y el cuerpo celular de la glía de Bergmann. La **CG** contiene los somas de los granos, células de Lugaro, células en candelabro y células unipolares en cepillo. Además, contiene los axones de las CP y las fibras musgosas. Modificado de Recio, 2008.

Desarrollo del cerebelo

En el ratón, el cerebelo se origina a partir del rombómero 1 a los 9 días de edad embrionaria (E9; Wingate, 2001). Entre E9 y E12, el eje antero-posterior del tubo neural dorsal sufre una rotación de 90º formando el eje medio-lateral del primordio del cerebelo (Sgaier et al., 2005). Este eje medio-lateral se mantiene durante la etapa adulta. A partir de E15.5 el cerebelo comienza a sufrir cambios morfológicos constituyéndose dominios moleculares parasagitales a lo largo del eje medio-lateral, siendo más acusados a E17, donde la aparición de 4 fisuras permite separar el cerebelo en 5 pliegues a lo largo del eje antero-posterior (Sgaier et al., 2005). A E18.5, el cerebelo ha adquirido una estructura donde se pueden distinguir distintos dominios moleculares a lo largo del eje antero-posterior. Además, en el momento del nacimiento el cerebelo ha establecido un sistema rudimentario de conexiones sinápticas topográficamente distribuidas en el eje antero-posterior (Sillitoe y Joyner, 2007).

En cuanto a la formación de los distintos tipos celulares, el cerebelo es una estructura única en el encéfalo ya que posee dos zonas germinales bien diferenciadas. Por un lado, los

granos, algunas neuronas nucleares profundas y las células unipolares en cepillo se generan en la región más posterior del rombómero 1 (Wingate, 2001). Por otro lado, la segunda zona germinal localizada en la parte dorsal del cuarto ventrículo, es el lugar donde se generan las CP y la mayoría de las interneuronas del cerebelo (Miale y Sidman, 1961; Altman y Bayer, 1985; Hashimoto y Mikoshiba, 2003). A P16 en el ratón, el cerebelo tiene todos sus tipos celulares organizados y distribuidos en las capas correspondientes tal como se observa en el animal adulto (Altman, 1972; Sillitoe y Joyner, 2007).

Conexiones

A la corteza cerebelosa llegan tres clases de proyecciones **aferentes**. La primera clase, las **fibras musgosas**, se origina desde distintos núcleos del encéfalo como los núcleos vestibulares o los núcleos reticulares laterales, y también desde la médula espinal (Berretta et al., 1991). Los terminales axónicos de las fibras musgosas se adentran en la CG y se ramifican en forma de rosetas en pequeñas estructuras de neuropilo denominadas "glomérulos cerebelosos". Las rosetas de las fibras musgosas no son el único constituyente de los glomérulos, que albergan también los botones dendríticos de granos y células unipolares en cepillo, así como los terminales axónicos de las células de Golgi (Ito, 1984, 2006). Así, las fibras musgosas contactan directamente dentro del glomérulo (sinapsis excitatoria), generalmente de forma bilateral con los granos, que envían sus axones a lo largo de la CM constituyendo las fibras paralelas, que a su vez establecen sinapsis excitatorias con las espinas dendríticas de múltiples CP. Una fibra musgosa realiza sinapsis excitatorias sobre unos 400-600 granos (Ito, 1984, 2006). Además, una única fibra paralela recorre unos 3 mm, lo que le permite contactar con unas 300 CP (Eccles et al., 1967). Como resultado final, una única fibra musgosa puede actuar sobre miles de CP.

La segunda clase de fibras aferentes son las **fibras trepadoras**, que se originan en varios núcleos de la oliva inferior (Ito, 2006). Las fibras trepadoras llegan hasta la CM, donde interaccionan con las dendritas de una única CP (Ramón y Cajal, 1911), aunque se ha demostrado que también pueden contactar con múltiples células gliales (Lin et al., 2005). Asimismo, se ha descrito que las fibras trepadoras pueden llegar a contactar con las células de Golgi (Sugihara et al., 1999). Como resultado de esta organización, una única fibra musgosa puede influir en cientos de CP, mientras que sólo un reducido número de CP está influenciado por una sola fibra trepadora.

La última clase de aferencias al cerebelo incluyen **aferencias noradrenérgicas** que llegan desde el *locus coeruleus* (Abbott y Sotelo, 2000), **aferencias colinérgicas** que se originan en el núcleo pedunculopontino (Jaarsma et al., 1997) y **aferencias serotonérgicas** que llegan desde los núcleos del rafe (Strahlendorf y Hubbard, 1983). La información que llega al cerebelo por estos sistemas aferentes converge en las CP, las neuronas que integran toda esta información.

Además de integrada, la señal debe ser modulada. Esta función la llevan a cabo, principalmente, los distintos tipos de interneuronas localizadas en las distintas capas del cerebelo, tanto excitatorias como inhibitorias. Excepto las células unipolares y los granos, que utilizan el glutamato como neurotransmisor y son interneuronas excitatorias, el resto de interneuronas del cerebelo son inhibitorias y utilizan GABA como mensajero químico (Nunzi et al., 2001).

Las fibras paralelas de los granos realizan sinapsis excitatorias con las dendritas de la mayoría de interneuronas inhibitorias del cerebelo, mayoritariamente con las células estrelladas y las células en cesto (Ekerot et al., 1995). A su vez, los axones de las **células unipolares en cepillo** establecen sinapsis excitatorias sobre los granos e incluso sobre dendritas de otras células unipolares (Diño et al., 1999; Nunzi et al., 2001; Ito, 2006). Las **células estrelladas** y las **células en cesto** reciben colaterales de las fibras trepadoras; y ambos tipos de interneuronas inhiben a las CP vía sinapsis axo-somática y axo-dendrítica, respectivamente. Mientras que una única CP contacta con varias células en cesto, cada célula en cesto recibe sinapsis de una única CP (Ito, 2006). Uno de los circuitos de inhibición por *feedback* es el que compete a las células de Golgi y los granos. Las **células de Golgi** se activan a través de sinapsis excitatorias desde las fibras paralelas de los granos (Pellionisz y Szentágothai, 1973); mientras que las células de Golgi establecen sinapsis inhibitorias (en el glomérulo) sobre los granos, y también sobre el otro tipo de interneurona glutamatérgica, las células unipolares en cepillo (Dugué et al., 2005). Otras interneuronas que modulan la información sensorial, pero sin contactar con las CP, son las **células de Lugaro** que son activadas por las fibras serotonérgicas y que realizan sinapsis inhibitorias con las células estrelladas, las células en cesto e incluso con las células de Golgi (Fox, 1959; Ito, 2008).

Una vez recibida y modulada la información, las CP transmiten la señal a los 3 pares de núcleos cerebelosos profundos a través de sinapsis inhibitorias (Sillitoe y Joyner, 2007). Estas proyecciones se disponen topográficamente de tal manera que las CP localizadas en el vermis proyectan a los núcleos más mediales, mientras que las situadas en los hemisferios proyectan a los núcleos cerebelosos profundos más laterales (Hawkes y Leclerc, 1986; Päällysaho et al., 1990). Por lo tanto, las CP son el eje central alrededor del que se organiza el circuito del cerebelo. Estas neuronas integran, modulan y procesan la información aferente, enviándola a distintos núcleos. Todo este complejo sistema permite al cerebelo tener la capacidad de regular la coordinación motora, el aprendizaje motosensorial y la memoria motora (Kim y Thompson, 1997; Allin et al., 2001).

Las células de Purkinje

Características estructurales

La CP es una de las neuronas de mayor tamaño del encéfalo; el diámetro de su soma oscila entre 25-40 μm (Mugnaini, 1972). El número de CP varía entre especies; en la rata se ha descrito que existe una densidad de entre 1.000-2.000 CP/mm^2 (Armstrong y Schild, 1970). Estas neuronas poseen un árbol dendrítico muy desarrollado, con numerosas espinas dendríticas. A nivel ultraestructural, en el citoplasma se observan numerosas cisternas de retículo endoplásmico rugoso (RER) y ribosomas libres (Herndon, 1963). Cerca del núcleo y en la base del tronco dendrítico aparece un retículo endoplásmico liso bastante grande. En estas células, el aparato de Golgi está mucho más desarrollado que en otros tipos neuronales. Las CP son neuronas particularmente ricas en lisosomas (Herndon, 1963). Su membrana nuclear se caracteriza por las numerosas interdigitaciones que presenta (Landis y Mullen, 1978). El núcleo de las CP es poco electrodenso, mientras que el nucleolo presenta una densidad muy alta a microscopía electrónica. En las dendritas se pueden observar numerosas mitocondrias y retículo endoplasmático liso, neurofilamentos y microtúbulos (Herndon, 1963).

Los axones de las CP emergen desde el polo basal del soma y se encuentran fuertemente mielinizados, a excepción del segmento inicial, que no tiene mielina (Chan-Palay, 1972). La longitud del segmento inicial del axón es de unas 17 μm con un diámetro alrededor de 1 μm. A lo largo de la CG o inmediatamente después de entrar en la SB, los axones de las CP dan lugar a una o más colaterales recurrentes (Chan-Palay, 1972; McCrea et al., 1976). Estas colaterales recorren unas distancias considerables; Frezik (1963) con experimentos de trazador marcó colaterales que discurrían desde el lóbulo VII hasta el V.

Desarrollo

Durante el desarrollo del cerebelo, las CP se originan en el neuroepitelio dorsal del cuarto ventrículo entre E10-E13 (Miale y Sidman, 1961; Hashimoto y Mikoshiba, 2003) y migran hacía el primordio del cerebelo a lo largo de las fibras de la glía radial (Hatten y Heintz, 1995). Cuando finaliza su migración, alrededor de P0, las CP muestran una forma fusiforme (Sotelo, 2004); a continuación, comienzan a emerger dendritas desde cualquier punto del soma. En este estadio, las CP, que previamente se encontraban dispersas, comienzan a formar una monocapa (Sillitoe y Joyner, 2007). Entre P3-P6 estas dendritas sufren una progresiva retracción. En ese momento, la célula adquiere una morfología estrellada caracterizada por la aparición en todas las direcciones de numerosas profusiones perisomáticas (Sotelo, 2004). A pesar de esta morfología irregular, estas neuronas mantienen una cierta polaridad, con un pequeño tronco dendrítico apical que finaliza en numerosos conos de crecimiento dendrítico. Es durante este periodo, P6-P10, cuando definitivamente la CP adquiere su polaridad. Entre P10 y P15 tiene lugar el crecimiento de las dendritas en

los dominios laterales. A partir de P15 ocurre un cambio de orientación en el plano de crecimiento dendrítico, finalizando su desarrollo completo alrededor de P30 (Berry y Bradley, 1976). La longitud del árbol dendrítico y el número de espinas dendríticas de las CP disminuyen con la edad (Weiss y Pysh, 1978). Estudios recientes han demostrado que cuando vectores adenovirales se inyectan en el ventrículo, entre E10.5 y E12.5, e infectan progenitores de CP, éstos dan lugar a subpoblaciones específicas de CP a lo largo del eje mediolateral (Hashimoto y Mikoshiba, 2003). Por lo tanto, ciertos progenitores de las CP parecen estar destinados a formar subpoblaciones específicas de CP y, además, este proceso es dependiente del momento de su diferenciación (Sotelo, 2004).

Se sabe que para la maduración de las CP es necesaria la interacción con CP vecinas con el fin de eliminar el exceso de sinapsis de las fibras trepadoras, para desarrollar así su árbol dendrítico y poder realizar sinapsis con los granos y los núcleos cerebelosos profundos en estadios más tardíos (Baptista et al., 1994; Hatten y Heintz, 1995; Wang y Zoghbi, 2001). Concretamente, en el vermis, las CP que se sitúan en los lóbulos I y X son las primeras en madurar, mientras que las de los lóbulos VI, VII y VIII son las últimas en hacerlo (Altman, 1972). Sin embargo, el proceso de maduración carece de sincronía: en un mismo lóbulo el estado de maduración entre CP vecinas puede ser distinto (Armengol y Sotelo, 1991). Por último, se sabe que durante la vida posnatal, el número de células del organismo se ajusta mediante procesos de muerte celular programada (Zhang et al., 1997). Con el fin de controlar el número de neuronas durante el desarrollo posnatal de las CP, ocurre un proceso de muerte neuronal por apoptosis e incluso por autofagia (Florez-McClure et al., 2004; Madalosso et al., 2005). Este proceso ocurre entre P1 y P10 con un pico máximo entre P4-P6; ello es resultado de la activación tanto de distintas vías intracelulares (como la de la caspasa 3) como extracelulares (activación de la microglía; Madalosso et al., 2005).

El ratón mutante PCD

Los modelos animales que presentan neurodegeneración constituyen una de las herramientas esenciales en el estudio de las enfermedades neurodegenerativas. El uso de estos animales permite abarcar distintos ámbitos de estudio, como son el análisis de la plasticidad neuronal, o ensayos de terapias de prevención, estabilización y recuperación funcional de un daño neuronal.

El ratón mutante PCD (del inglés: *Purkinje Cell Degeneration*) sufre la degeneración selectiva y progresiva de al menos cuatro tipos neuronales específicos (Mullen et al., 1976). En el presente trabajo de Tesis Doctoral se ha empleado el ratón mutante PCD como modelo de ataxia cerebelosa, consecuencia de la pérdida de las principales neuronas encargadas del movimiento coordinado, las CP (Landis y Mullen, 1978). Hemos estudiado los mecanismos moleculares y celulares que ocurren tanto en las etapas previas a la neurodegeneración -y que hemos denominado como etapa pre-neurodegenerativa- como aquéllas que suceden

durante el proceso de muerte. La detección temprana e identificación de los mecanismos que provocan la muerte neuronal puede suponer nuevas vías para el desarrollo de terapias preventivas ante la aparición de enfermedades que afecten a distintos tipos neurales.

La mutación pcd

La mutación pcd apareció espontáneamente en la estirpe C57BR/cdJ del ratón (*Mus musculus* L. 1758) en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EE.UU.). Posteriormente, la mutación se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen et al., 1976). Hasta el momento se han identificado 10 alelos distintos de la mutación pcd (Wang y Morgan, 2007; Viviani et al., 2008). La mutación original se denominó pcd^{1J} (Fernández-González et al., 2002). A continuación, también de forma espontánea, se hallaron dos alelos mutantes pcd adicionales, pcd^{2J} y pcd^{3J}, que aparecieron en las estirpes SM/J y BALB/cByJ, respectivamente. Posteriormente se han descrito otras dos formas de mutación espontánea del gen, una en la estirpe C.Cg-Igh-6^{tm1Cgn} y que se ha denominado pcd^{7J} (Samples et al., 2005) y otra aparecida en la estirpe C57BL/6J, denominada pcd^{8J} (Karst et al., 2008). Los alelos mutantes pcd^{4J}, pcd^{6J} y pcd^{btlr} se han generado químicamente, mientras que mediante mutagénesis dirigida, se han desarrollado las mutaciones pcd^{JWG} y pcd^{5J} (Chakrabarti et al., 2006; Wang y Morgan, 2007).

La mutación original (pcd^{1J}) muestra el fenotipo más grave, mientras que la pcd^{2J} es la más leve (Fernández-González et al., 2002; Chakrabarti et al., 2006; Wang y Morgan, 2007). La mutación pcd se localiza en el cromosoma 13 del ratón y se define como autosómica recesiva (Mullen et al., 1976). La región portadora de la mutación pcd se ha delimitado utilizando marcadores polimórficos de ADN (Campbell y Hess, 1996), en un segmento genómico de 0.61 ± 0.33 megabases. En esta región, localizada entre los marcadores D13Mit157 y D13Mit167 (Fernández-González et al., 2002), se encuentra el gen *nna1* (también conocido como *agtpbp1*), afectado en la mutación. El ARN mensajero (ARNm) codificado por el gen se encuentra reducido o alterado en su estructura (salvo en la mutación pcd^{5J}), mientras que la expresión de los dos genes que lo flanquean no cambia, al menos en los mutantes PCD^{1J}, PCD^{2J} y PCD^{3J} (Fernández-González et al., 2002). Los niveles de expresión del ARNm de *nna1* varían según el tipo de ratón mutante PCD. El mutante PCD^{1J} (empleado en esta Tesis Doctoral) no presenta diferencias en la secuencia codificante del gen *nna1* con respecto al alelo silvestre; sin embargo, los niveles de expresión, tanto de ARNm como de proteínas, son prácticamente nulos (Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007). Por lo tanto, se ha propuesto que la mutación pcd^{1J} afecta a una secuencia reguladora del gen *nna1*. En los mutantes PCD^{2J}, PCD^{3J} y PCD^{5J}, la mutación produce inserciones o delecciones en la propia región codificante del gen, induciendo a su vez cambios en la estructura de la proteína o en su estabilidad (Fernández-González et al., 2002; Chakrabarti et al., 2006; Wang y Morgan, 2007). En el resto de mutaciones pcd, la alteración genética exacta dentro del gen *nna1* aún se desconoce.

El gen *nna1*

El gen *nna1* codifica para la proteína Nna1 (proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía) que se ha asociado con procesos de diferenciación y regeneración axonal (Harris et al., 2000). El gen *nna1* codifica, en el ratón, 3 transcritos distintos de 1.218, 1.174 y 789 aminoácidos (www.ensembl.org/Mus_musculus/Gene/Summary?db=core;g=ENSMUSG00000021557; Fig. 5). Se ha detectado una expresión importante de su ARNm (del mayor de los transcritos) en las CP y los granos del cerebelo, en las células mitrales del BO, en algunas subpoblaciones de neuronas talámicas, en fotorreceptores de la retina y en espermatozoides maduros y en desarrollo (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002; Rodríguez de la Vega et al., 2007).

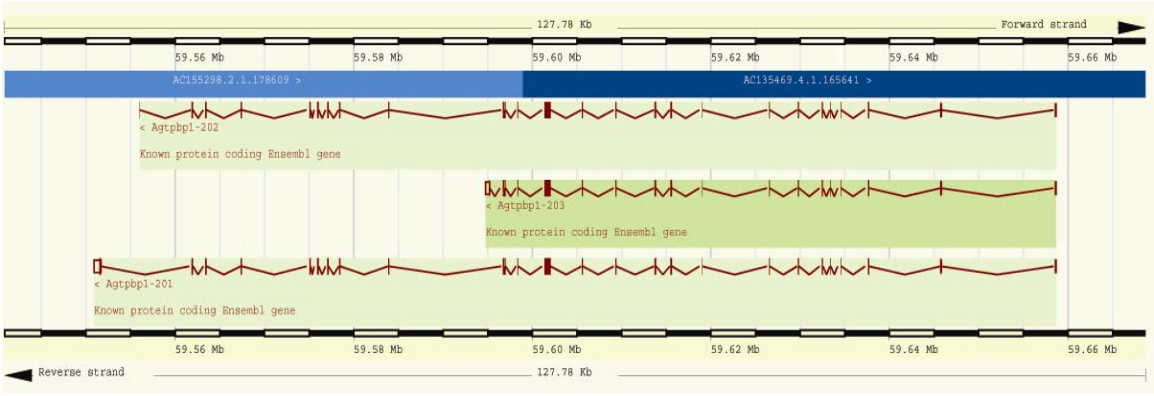

Figura 5. **Transcripción del gen *nna1*.** La transcripción del gen *nna1* del ratón tiene como resultado la síntesis de 3 transcritos (en rojo) distintos que se originan por el proceso de "corte-empalme" alternativo.

Recientemente se ha descrito que la proteína Nna1 pertenece a la familia de metalocarboxipeptidasas M14D (Wang et al., 2006; Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Esta proteína presenta 2 dominios bien diferenciados, un dominio zinc-carboxipeptidasa y otro dominio de unión a ATP/GTP (Harris et al., 2000; Chakrabarti et al., 2006; Wang et al., 2006). Además, contiene múltiples sitios susceptibles de fosforilación mediada por diferentes quinasas. En concreto, posee cuatro sitios con la secuencia consenso para fosforilación mediada por tirosina-quinasas.

Estudios *in vitro* han demostrado la localización de esta proteína tanto citoplasmática como nuclear (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002). Por último, se ha demostrado que el dominio zinc-carboxipeptidasa es esencial para la función de la proteína, ya que su ausencia está implicada en el proceso neurodegenerativo (Harris et al., 2000; Wang et al., 2006).

A pesar de haberse descrito que la proteína Nna1 pertenece a la familia de las metalocarboxipeptidasas, su función concreta aún no se conoce. Estudios recientes han propuesto que esta proteína pudiera estar involucrada en una de las modificaciones postraduccionales que sufre la α–tubulina (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Más concretamente, se ha sugerido que la proteína Nna1 interviene en la destirosinación; es decir, en la escisión del resto de tirosina del extremo carboxi-terminal de la α–tubulina, proceso

que tiene lugar durante la estabilización de los microtúbulos (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987; Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Sin embargo, aún no existen evidencias directas que demuestren esta posible función catalítica de la proteína Nna1.

Los microtúbulos son las estructuras más desarrolladas del citoesqueleto, y participan en múltiples funciones, como la división celular, el mantenimiento de la morfología celular, la migración, el transporte intracelular (Schnapp et al., 1985) o el crecimiento axonal (Yamada et al., 1970).

Los microtúbulos están constituidos por distintos heterodímeros de αβ-tubulina que polimerizan. En las neuronas participan muchos genes en la síntesis de los distintos tipos α– y β-tubulina (Cleveland y Sullivan, 1985). Las tubulinas son objeto de distintas modificaciones postraduccionales, incluyendo procesos de fosforilación de la β-tubulina, mediado por la caseina kinasa II (Gard y Kirschner, 1985), acetilación de la α-tubulina, catalizado por la tubulina acetilasa (L'Hernault y Rosenbaum, 1985) y ciclos de tirosinación/destirosinación de la α–tubulina (Barra et al., 1974, 1988; Argarana et al., 1980). Es en el estudio de este último proceso en el que nos vamos a centrar.

El ciclo de tirosinación/destirosinación es específico de la α-tubulina, y parece que interviene en el mantenimiento de la estabilidad de los microtúbulos. Esta modificación produce ciclos de adición/escisión de residuos de tirosina del extremo carboxi-terminal de la α-tubulina. La eliminación de los restos de tirosina es catalizada por la tubulina carboxipeptidasa (tubCP), mientras que la adición la lleva a cabo la tubulina tirosina ligasa (TTL; Ersfeld et al., 1993). Hay que resaltar que la TTL ha sido aislada y bien caracterizada (Erck et al., 2005), sin embargo el gen que codifica la tubCP aún no se conoce. Como consecuencia de estas modificaciones postraduccionales se conocen tres grados distintos de tirosinación de la α-tubulina: la forma tirosinada (Tyr-Tub), la forma destirosinada (Glu-Tub), y la forma no tirosinable, también conocida como Δ-tubulina y que se genera por la escisión del resto de ácido glutámico (Glu; Barra et al., 1980; Paturle et al., 1989). El estado tirosinado de la α-tubulina se ha asociado a microtúbulos dinámicos, por ejemplo, de células proliferativas (Gundersen y Bulinski, 1986), mientras que la forma destirosinada se encuentra asociada a poblaciones de microtúbulos estables (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987).

Se ha propuesto que durante el proceso de estabilización de los microtúbulos ocurra la secuencia:

Tyr-Tub ⟹ Glu-Tub ⟹ Δ-Tub

y que esta secuencia esté catalizada por la misma tubCP (Paturle-Lafanechère et al., 1994). Hasta el momento, todos los trabajos encaminados al análisis de la tubCP se han basado en el estudio de su efecto; es decir, en el análisis del ciclo de tirosinación/destirosinación de los microtúbulos de un determinado tipo celular. Estudios recientes han propuesto que la proteína sintetizada a partir del gen *nna1* fuera la tubCP (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Por lo tanto, en el presente trabajo de Tesis Doctoral analiza-

remos el grado de tirosinación/destirosinación de la α-tubulina de los microtúbulos de las CP, tanto de ratones control como de ratones mutantes PCD.

Efectos de la mutación pcd

Las manifestaciones fenotípicas y los cambios neuromorfológicos que ocurren en los distintos tipos de mutantes PCD comparten muchas similitudes, a excepción del PCD^{2J} que muestra alteraciones mucho más leves que el resto de variantes (Wang y Morgan, 2007). Los datos que vamos a describir se referirán desde ahora a los mutantes PCD^{1J}, que son los empleados en este trabajo.

La mutación pcd^{1J} produce la degeneración posnatal de aquellas poblaciones neuronales que transcriben el gen *nna1* (Fernández-González et al., 2002). Degeneran las CP del cerebelo (provocando una ataxia cerebelosa muy severa; Mullen et al., 1976; Landis y Mullen, 1978), las células mitrales del bulbo olfatorio (BO; produciendo alteraciones en la transmisión de la información olfatoria; Mullen et al., 1976; Greer y Shepherd, 1982; Bartolomei y Greer, 1998; Valero et al., 2006; Recio et al., 2007) y determinadas neuronas de los núcleos talámicos (O'Gorman y Sidman, 1985; O'Gorman, 1985). Además, en estos mutantes existe una degeneración lenta y progresiva de los fotorreceptores (Mullen y LaVail, 1975; Blanks et al., 1982; LaVail et al., 1982). En primer lugar mueren las CP, esta degeneración es muy rápida y ocurre entre la tercera y la cuarta semana de edad posnatal. A continuación, alrededor de los 50 días de edad posnatal comienzan a degenerar las neuronas talámicas, permaneciendo tan solo el 10% de éstas a P90 (O'Gorman y Sidman, 1985). Aunque los núcleos talámicos reciben aferencias del cerebelo, no parece ser que la degeneración de las neuronas talámicas sea secundaria a la pérdida de las CP. Por último, la degeneración de las células mitrales comienza a los dos meses de edad extendiéndose hasta el cuarto mes (Valero et al., 2006) mientras que la de los fotorreceptores es mucho más tardía (Mullen y LaVail, 1975; Blanks et al., 1982; LaVail et al., 1982).

Como consecuencia de la pérdida, primaria o secundaria, de los distintos tipos neuronales, los ratones mutantes PCD muestran alteraciones en distintos *tests* neurofisiológicos y de comportamiento. Por ejemplo, con el *test* del Rota-rod se ha comprobado que la mutación provoca alteraciones en el control motor (Le Marec y Lalonde, 1997). Además, se ha visto con los *test* de la plataforma sumergida y plataforma visible, que el ratón mutante PCD muestra un déficit en el proceso de aprendizaje espacial, aunque, sorprendentemente, a pesar de la degeneración de los fotorreceptores de la retina, no se han detectado defectos en la capacidad visual, al menos hasta los 4 meses de edad (Goodlett et al., 1992). Otro comportamiento afectado en el ratón mutante PCD es el del reflejo condicionado de parpadeo, que se encuentra retardado (Chen et al., 1996).

Los animales mutantes machos son estériles; presentan un esperma anormal, escaso y carente de movilidad, aunque son capaces de copular. En cambio, las hembras mutantes sí son fértiles, aunque presentan serias dificultades en la crianza de la escasa descendencia que

conciben (Mullen et al., 1976). Todos estos problemas hacen que la cría de los animales PCD sea complicada. Para conseguir animales mutantes se deben cruzar animales heterocigotos portadores de la mutación (+/pcd) que conciben animales homocigotos para la mutación con una probabilidad mendeliana del 25%. En el presente trabajo hemos utilizado ratones de la estirpe DBA con este alelo, ya que la cría es más efectiva. Para llevar a cabo la transferencia de este alelo pcd^{1J} desde la estirpe C57BL/6J a la estirpe DBA establecimos un programa de cruzamientos y controles que describiremos detalladamente en el apartado correspondiente de la sección de Material y Métodos.

Efecto de la mutación pcd en el cerebelo

Debido a la sencilla organización laminar de la corteza cerebelosa y a que se dispone de un buen conocimiento de su citología y arquitectura sináptica, el cerebelo es una de las regiones encefálicas más estudiadas (Ramón y Cajal, 1911; Voogd et al., 1985). Esto ha permitido que existan numerosos estudios en distintos modelos patológicos con alteraciones cerebelosas (Sidman et al., 1965), permitiendo asimismo mejorar la comprensión de su organización y fisiología.

Alteraciones neuropatológicas

En el animal mutante PCD la muerte de las CP comienza alrededor de la tercera semana de edad posnatal (Landis y Mullen, 1978). En concreto, la degeneración comienza en la zona medial del cerebelo, el vermis, siendo más tardía en las zonas más laterales del mismo (Zhang et al., 1997). Puesto que la muerte de estas neuronas es anterior en el vermis que en el resto del cerebelo, en el presente Trabajo hemos restringido el análisis de las etapas preneurodegenerativa y neurodegenerativa de las CP a esta estructura.

Curiosamente, el proceso degenerativo de las CP difiere dependiendo de los lóbulos cerebelosos. Así, en la zona nodular (lóbulo X y zona ventral del lóbulo IX) la muerte de las CP es más tardía que en el resto de los lóbulos del cerebelo. Alrededor de los 60 días de edad posnatal la práctica totalidad de CP ha desaparecido del vermis del cerebelo del ratón mutante PCD. Las causas por las que las CP localizadas en la zona nodular tienen mayor resistencia ante el proceso neurodegenerativo que sufre el ratón mutante PCD serán discutidas en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

A las 6 semanas de vida sólo unas cuantas células persisten en los hemisferios laterales del cerebelo, siendo muy escasas a las 7 semanas y localizándose mayoritariamente en la zona nodular (Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003; Kyuhou et al., 2006). A esa edad, la mayor parte de los restos de esta neurodegeneración ya han sido eliminados por elementos microgliales (Landis y Mullen, 1978). La CM sufre una reducción significativa de su espesor, en primera instancia por la pérdida de las dendritas de las CP y a edades más tardías por la pérdida de las fibras paralelas, aunque continúan presentes las células en cesto y las células estrelladas rodeadas por un alto número de células gliales reactivas en la zona (Mullen et al., 1976).

A pesar de que la pérdida de CP es la manifestación más evidente en la degeneración del cerebelo de estos animales, ocurre una degeneración transneuronal secundaria de otros elementos neuronales. Esta degeneración retrógrada afecta a más del 90% de los granos del cerebelo, muchos de los cuales mueren por apoptosis (Zhang et al., 1997), al menos hasta los 6 meses de edad (Ghetti et al., 1978; Triarhou et al., 1985). Por el contrario, no se aprecia una reducción llamativa en la concentración de células de Golgi en la CG (Mullen et al., 1976).

La muerte de las CP desencadena la degeneración del 20% de las neuronas del complejo olivar inferior a las 4 semanas de edad, mientras que a los 10 meses de edad ha desaparecido el 50% (Ghetti et al., 1987; Shojaeian et al., 1988; Triarhou y Ghetti, 1991). Puesto que estas neuronas son el origen de las fibras trepadoras (Desclin, 1974; Courville y Faraco-Cantin, 1978) su degeneración influirá en la disminución de estas aferencias en el cerebelo. Por último, la degeneración anterógrada origina la pérdida del 21% de las neuronas de los núcleos cerebelosos profundos y una reducción en el diámetro de las neuronas supervivientes en un 14%, produciéndose una mayor densidad de empaquetamiento de las neuronas supervivientes y la disminución del volumen de estos núcleos a la mitad (Wassef et al., 1986; Triarhou et al., 1987).

Glía y neurodegeneración

Además de las neuronas, el cerebelo está constituido por numerosas células gliales de los tres tipos, en concreto, la **microglía**, la **astroglía** y la **oligodendroglía**. La células de **microglía** participan en procesos de infección, trauma, isquemia o neurodegeneración; la microglía tiene la capacidad de eliminar las células muertas (Aloisi, 2001; Kim y de Vellis, 2005). La **astroglía** lleva a cabo funciones estructurales como el sostén de la red neuronal o el mantenimiento de la barrera hematoencefálica. Además, los astrocitos regulan la homeostasis del espacio extracelular, regulan el metabolismo energético y algunos incluso actúan como células madre del sistema nervioso adulto (Álvarez-Buylla et al., 2002; Kettenmann y Ransom, 2005). En la sinapsis, los astrocitos tienen la capacidad de recaptar y liberar neurotransmisores y, más aún, estas células participan activamente en las sinapsis, dando lugar al concepto de "sinapsis tripartita" (Araque, 2006). Por último, al igual que la microglía, los astrocitos tienen la capacidad de actuar en procesos de trauma, isquemia, degeneración e infección (Pekny y Nilsson, 2005; Correa-Cerro y Mandell, 2007). En último lugar, los **oligodendrocitos** son los responsables de la formación de la vaina de mielina, aunque también se han descrito funciones de sostén y unión para las neuronas (Barres, 2008). En la última década, los estudios sobre la glía en su papel en condiciones patológicas, sobre todo de astrocitos y microglía, han comenzado a ser más numerosos.

Se sabe que cuando existe un daño en el sistema nervioso, ya sea por procesos infecciosos, trauma, isquemia o procesos neurodegenerativos, la microglía y los astrocitos se activan, produciéndose un proceso inflamatorio conocido como "gliosis reactiva" (Hanisch, 2002, van Rossum y Hanisch, 2004; Milligan y Watkins, 2009). De manera muy

simplista, esta respuesta glial está encaminada a conferir neuroprotección a la región dañada. Como consecuencia de este proceso, tanto la microglía como los astrocitos sufren fuertes cambios morfológicos. La microglía sufre una hipertrofia, aumenta el tamaño celular y sus ramificaciones se acortan y aumentan su grosor (Kim y de Vellis, 2005). Los astrocitos también se hipertrofian y experimentan un fuerte incremento en la expresión de una proteína del citoesqueleto, la GFAP (del inglés: *Glial Fibrillary Acidic Protein*). Una vez activadas, estas células gliales secretan un amplio rango de sustancias pro-inflamatorias que, por una parte, permiten amplificar más la respuesta inflamatoria y, por otra, confieren un entorno neuroprotector en la región afectada (Streit, 2002; Minghetti et al., 2005; Escartin y Convento, 2008). Sin embargo, en los últimos años se sabe que, en determinadas ocasiones, la glía reactiva desarrolla una respuesta inflamatoria exacerbada, que en vez de conferir neuroprotección al sistema tiene consecuencias neurotóxicas para el entorno (Wyss-Coray y Mucke, 2002; Zeng et al., 2005; Zhang et al., 2005). Es decir, la glía reactiva puede presentar una función dual y antagónica, positiva y negativa, ante un proceso neurodegenerativo (Wyss-Coray y Mucke, 2002). Aunque los oligodendrocitos no intervienen de forma activa durante el proceso de gliosis, sí se sabe que estas células pueden estar afectadas por una respuesta descontrolada de la glía reactiva (Li et al., 2005, 2008).

La respuesta glial en el proceso patológico pre-neurodegenerativo y neurodegenerativo del mutante PCD es totalmente desconocida. Es por ello que en el presente trabajo de Tesis Doctoral analizaremos durante el proceso degenerativo de las CP del ratón mutante PCD el grado de activación glial. Además, compararemos el patrón de respuesta que tiene lugar en el cerebelo ante la pérdida de las CP, con el que ocurre en el BO durante el periodo degenerativo de las células mitrales. Más aún, analizaremos el estado de los oligodendrocitos tanto en el cerebelo como en el BO.

Alteraciones ultraestructurales de las células de Purkinje del ratón PCD

Estudios previos han mostrado alguna de las alteraciones en la CP del ratón mutante PCD. En condiciones normales, los animales silvestres de entre P10 y P12 presentan una gran acumulación de polisomas libres en la parte basal de la CP (masa basal de polisomas) que permanece durante varios días, pero que se desorganiza hacia las dos semanas de edad asociándose a endomembranas, formando pilas alineadas de cisternas de RER (Larramendi, 1969). A la tercera semana de vida posnatal, las células van adoptando su forma característica y diversos orgánulos se disponen alrededor del núcleo (Landis y Mullen, 1978). En cambio, los ratones mutantes PCD retienen aún la masa basal de polisomas, y presentan menos cisternas de RER (Landis y Mullen, 1978). En algunos casos se han observado prolongaciones de RER convergiendo en una cisterna central dilatada y carente de polisomas (Landis y Mullen, 1978). Esta configuración inusual del RER es normal en las CP inmaduras. Sin embargo, y al igual que la masa basal de polisomas, esa estructura se mantiene en las CP de los ratones mutantes PCD hasta su completa degeneración. Todos estos cambios ultraestructurales observados inicialmente en el sistema de endomembranas han sido co-

rroborados con estudios de Biología Molecular (Kyuhou et al., 2006). Otra alteración observada en las CP de los animales mutantes PCD es la presencia de unas inclusiones citoplasmáticas formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa, denominadas *nematosomas* (Grillo, 1970). Estos nematosomas se observan con regularidad a partir de P18-P22, y ocasionalmente, ya desde P15. Estas estructuras no se han observado en ratones normales (Landis y Mullen, 1978). En el presente trabajo de Tesis Doctoral pretendemos profundizar en las alteraciones celulares, tanto citoplasmáticas como nucleares, que tienen lugar en la CP del ratón mutante PCD en los periodos pre-neurodegenerativos y neurodegenerativos y que conducen a su muerte.

Alteraciones sinápticas de las células de Purkinje del ratón PCD

Como ya hemos descrito anteriormente, las CP alcanzan su madurez entre la segunda y la tercera semana de edad posnatal (Landis y Mullen, 1978). Las colaterales axónicas forman sinapsis y los procesos dendríticos se expanden con normalidad en la CM. Las CP comienzan a recibir sinapsis de los axones de los distintos tipos de interneuronas del cerebelo (Landis y Mullen, 1978). Se ha observado que durante la tercera semana de edad posnatal las espinas dendríticas de las CP de los ratones mutantes PCD están envueltas por procesos gliales, pudiendo afectar a la sinaptología de estas células. Sin embargo, muchas de las espinas presentan engrosamientos en la membrana que asemejan elementos postsinápticos (Rakic y Sidman, 1973; Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003). Hay que destacar que, en condiciones normales, las CP más maduras presentan diferenciaciones de membrana idénticas a elementos postsinápticos, que se encuentran enfrentados a procesos gliales o a fibras paralelas, pero no a axones inhibitorios (Landis y Reese, 1974; Sotelo, 1975; Landis y Mullen, 1978).

Las fibras paralelas que están junto a estos engrosamientos de la membrana de las dendritas parecen contactar directamente sobre la base de los troncos dendríticos. Estas sinapsis aberrantes, no observadas en los animales silvestres, se mantienen hasta que la célula ha degenerado completamente (Landis y Mullen, 1978).

Alteraciones neuroquímicas

Como consecuencia de la pérdida de las CP, en el cerebelo de los ratones mutantes PCD se producen cambios en la neuroquímica de los distintos tipos neuronales. Por ejemplo, a diferencia de lo que ocurre en otros modelos animales donde degeneran las CP, la expresión del receptor de unión a kainato aumenta (Griesser et al., 1982). Por el contrario, el número de receptores AMPA (del inglés: *a-Amino-3-hydroxy-5-Methyl-4-isoxazolePropionic Acid*) desciende en la CM de los animales mutantes PCD (Fragioudaki et al., 2002) presumiblemente por la pérdida de CP (Makowiec et al., 1991). Debido a la muerte de las CP, la densidad de terminales GABAérgicos, tanto en los núcleos cerebelosos profundos como en los núcleos vestibulares laterales, es menor en los ratones mutantes PCD (Grüser-Cornehls y Bäurle, 2001). Sin embargo, se ha observado un aumento en el número de neuronas glicina-positivas en los núcleos cerebelosos profundos, presumiblemente reflejando un meca-

nismo compensatorio ante la pérdida de terminales GABAérgicos (Bäurle y Grüser-Cornehls, 1997; Bäurle et al., 1997).

Se ha detectado también un aumento en la concentración de serotonina en el cerebelo de los ratones mutantes PCD^{1J} (Ohsugi et al., 1986; Ghetti et al., 1988). Este efecto parece ser dependiente de la edad; mientras que en los ratones mutantes jóvenes de un mes de edad no se detectan variaciones en la concentración de este neurotransmisor (Ohsugi et al., 1986; Ghetti et al., 1988), en ratones PCD de 3 meses de edad existe un aumento de la concentración de serotonina en el cerebelo. Este incremento está acompañado de un aumento en la síntesis de transportadores y de receptores de este neurotransmisor para una mayor recaptación, tanto en la corteza cerebelosa como en los núcleos cerebelosos profundos (Ghetti et al., 1988; Le Marec et al., 1998). Del mismo modo, el contenido de noradrenalina también aumenta con la edad en los ratones mutantes PCD (Ghetti et al., 1981; Felten et al., 1986). En la CG de los ratones mutantes PCD de edad avanzada existe un aumento de expresión de la proteína calretinina mientras que existe un descenso drástico en la actividad NADPH diaforasa (Alcalde, 2003). Además, también se observado en el cerebelo la expresión *de novo* de la proteína calbindina D-28k (CB). Finalmente, se ha observado que tras nueve meses de degeneración, aparece la expresión de la proteína parvalbúmina en neuronas de los núcleos cerebelosos profundos no observada en los animales control (Alcalde, 2003).

Todos estos cambios demuestran una gran plasticidad neuroquímica, donde neurotransmisores y neuromoduladores modifican su expresión a lo largo del proceso neurodegenerativo, con patrones espacio-temporales perfectamente definidos. Por último, estos cambios no influyen tan sólo a las poblaciones neuronales afectadas sino también a las células supervivientes.

Compartimentos nucleares

Como hemos señalado anteriormente, se han descrito distintas alteraciones ultraestructurales que ocurren en las CP en degeneración. Sin embargo, poco se sabe de las posibles alteraciones que tienen lugar en los distintos compartimentos nucleares de la neurona. En este contexto, se asume que el núcleo celular está organizado en compartimentos estructurales y funcionales que están implicados fundamentalmente en: a) la preservación del ADN y transcripción del mismo; b) el procesamiento del ARN y c) la formación de ribosomas. Estos compartimentos nucleares incluyen los territorios cromosómicos y las regiones intercromatínicas, entre las que se encuentra el nucleolo (Misteli et al., 1997; Cremer y Cremer, 2001). La organización de los compartimentos nucleares es muy dinámica y refleja el estado funcional de las células (Lamond y Earnshaw, 1998).

En el caso de las neuronas de mamíferos, la reorganización de los compartimentos nucleares se ha observado en respuesta a cambios en la expresión génica asociados a condi-

ciones fisiológicas y experimentales, pero también en ciertas patologías neurodegenerativas (Yamada et al., 2001; Villagra et al., 2004). Concretamente, existen evidencias de una relación entre los componentes de la maquinaria de señalización de daño y reparación del ADN y la fisiopatología de ciertas enfermedades neurodegenerativas humanas (Caldecott, 2004; McKinnon, 2004; Francisconi et al., 2005; Paulson y Miller, 2005). Por todo ello, el estudio de la organización de los compartimentos nucleares y la maquinaria de señalización de daño y reparación del ADN en las CP del ratón PCD durante la degeneración es de gran interés para entender las fases y los componentes celulares involucrados en el proceso de neurodegeneración.

Los territorios cromosómicos

Se pensaba que los cromosomas durante la interfase se extendían a lo largo del núcleo celular adquiriendo una morfología de finas hebras entrelazadas. Hoy día se sabe que durante el ciclo celular cada cromosoma mantiene su individualidad, ocupando un espacio limitado y determinado, conocido como **territorio cromosómico**. En general, los territorios cromosómicos comprenden los cromosomas interfásicos y sus dominios de eucromatina y heterocromatina (Cremer y Cremer, 2001; Cremer et al., 2006). El interior de los territorios cromosómicos está conectado por una compleja red de canales que permite la accesibilidad a secuencias profundas del genoma de distintos factores de regulación (Cremer et al., 2006; Meaburn y Misteli, 2007). Dentro de los territorios cromosómicos, la disposición estructural del ADN no es aleatoria. Por ejemplo, los brazos de los cromosomas se encuentran lo más separados unos de otros, y las regiones de los cromosomas ricas en genes se encuentran separadas de aquéllas donde son escasas (Meaburn y Misteli, 2007). Esta organización probablemente contribuya a la regulación coordinada de distintos conjuntos de genes. Más aún, esto puede reflejar que la heterocromatina y la eucromatina se presenten en el núcleo como dominios separados y definidos.

En las células eucarióticas de plantas los cromosomas tienden a estar polarizados con los telómeros en un extremo y los centrómeros en el extremo contrario. En cambio, en las células eucarióticas de los animales, en concreto de los mamíferos, cada cromosoma adquiere una localización específica respecto al centro del núcleo (Meaburn y Misteli, 2007). Los cromosomas se organizan adoptando un patrón radial, con algunos localizados preferentemente en la periferia del núcleo mientras que otros se localizan en la zona central. Esta disposición radial permite la agrupación preferencial entre cromosomas vecinos (Cremer et al., 2006; Meaburn y Misteli, 2007). Aunque todavía se desconoce qué factores controlan esta organización específica, sí se sabe que la organización radial de los cromosomas depende de la cantidad de ADN y de la actividad transcripcional de sus distintos dominios genómicos (Meaburn y Misteli, 2007).

La organización no aleatoria del genoma permite una compartimentación funcional en el espacio nuclear. Las regiones activas e inactivas del genoma se encuentran separadas,

permitiendo transcribir o reprimir distintos genes con mayor eficacia. La porción de ADN que no se transcribe suele encontrarse densamente plegada en las regiones de heterocromatina, mientras que los genes transcripcionalmente activos y los inducibles se localizan en las regiones de eucromatina (Ferreira et al., 1997; Carvalho et al., 2001).

La eucromatina está constituida por regiones de cromatina laxa que conservan una configuración nucleosomal que permite la transcripción. Su configuración estructural es en forma fibras de 30 nm o dominios en bucles. Generalmente, la heterocromatina se ha clasificado en facultativa y constitutiva. La heterocromatina constitutiva contiene secuencias repetidas de ADN que no se transcriben y que corresponden a regiones centroméricas y teloméricas. La heterocromatina facultativa es aquélla que puede ser transcrita pero se encuentra silenciada temporal o indefinidamente. Contiene genes inactivos cuya expresión no se requiere para mantener el fenotipo o funcionalidad de un tipo celular concreto. El grado de heterocromatinización depende del metabolismo celular y su mantenimiento está sujeto, en gran medida, al reclutamiento de genes silentes (Lamond y Earnshaw, 1998; Spector, 2001; Carmo-Fonseca, 2002; Cremer et al., 2004, 2006; Dillon, 2006).

Las CP presentan un núcleo grande en el que la cromatina aparece uniformemente dispersa, aunque aparecen algunos agregados en la periferia, cerca de la envuelta nuclear (Herndon, 1963; Khan, 1993). Este estado eucromático indica una gran disponibilidad de dominios de cromatina "abierta" y, por lo tanto, accesible para la transcripción. Esto coincide con la alta actividad metabólica y funcional que presentan las CP (Womack y Khodakhah, 2002; Swensen y Bean, 2003; Davie et al., 2008). La proporción entre heterocromatina y eucromatina se relaciona con diversas modificaciones en las histonas nucleosomales (Tabla 1). La eucromatina está generalmente enriquecida en histonas H3 y H4 hiperacetiladas (Hendzel et al., 1998; Görisch et al., 2005). La heterocromatina se caracteriza por la presencia de histona H3 hipoacetilada, trimetilada en la lisina 9 y monometilada en la 27 y por la presencia, también, de la histona H4 trimetilada en la lisina 20 (H4-K20-3Me; Peters et al., 2003; Rice et al., 2003; Kourmouli et al., 2004). Se considera que la trimetilación de la histona H3 favorece su interacción con proteínas estructurales de la heterocromatina, como HP1α (proteína 1α de la heterocromatina), que contribuyen al mantenimiento del alto nivel de condensación de este tipo de cromatina (Lachner et al., 2001; Nielsen et al., 2001; Jiang et al., 2004; Maison y Almouzni, 2004; Misteli, 2005). La presencia de estas modificaciones en las histonas y la aparición de ciertas moléculas (como HP1α) sirven como marcadores citológicos de los distintos tipos de cromatina y de su estado funcional (Tabla 1). En la actualidad se acepta que la configuración de la cromatina en las neuronas es muy dinámica y capaz de remodelarse estructural y funcionalmente de forma muy rápida. Además, es posible que los cambios en la conformación de la cromatina sean necesarios para la protección del genoma frente a diversos tipos de estrés y para la expresión de genes de respuesta a estrés celular (Pena et al., 2000; Navascués et al., 2008).

Tabla 1. Marcadores moleculares del estado de la cromatina

Marcador	Cromatina
H3 hiperacetilada	Eucromatina
H4 hiperacetilada	Eucromatina
H3-K9-3Me	Heterocromatina
H3-K27-Me	Heterocromatina
H4-K20-3Me	Heterocromatina
HP1α	Heterocromatina

H3-K9-3Me: histona H3 trimetilada en la lisina 9; H3-K27-Me: histona H3 monometilada en la lisina 27; H4-K20-3Me: histona 4 trimetilada en la lisina 20; HP1α: proteína 1 alfa de la heterocromatina.

Las regiones intercromatínicas

Entre los territorios cromosómicos, e incluso dentro de un único territorio cromosómico, se encuentra el espacio intercromosómico o intercromatínico (Cremer et al., 2004, 2006). El espacio situado en el límite entre las regiones intercromatínicas y los territorios cromosómicos se conoce como la región pericromatínica (Fakan y van Driel, 2007). En esta zona hay numerosos complejos macromoleculares -no cromatínicos implicados en procesos de transcripción, corte y empalme (splicing), replicación y/o reparación del ADN, entre otros (Lamond y Spector, 2003; Misteli, 2005). Los compartimentos o estructuras de las regiones intercromatínicas son muy dinámicos y su organización estructural y espacial está relacionada, principalmente, con los procesos que regulan la expresión del genoma (Misteli, 2001; Fakan y van Driel, 2007). Las regiones intercromatínicas incluyen: a) **el nucleolo**, lugar de formación de las unidades ribosómicas, b) **las fibrillas pericromatínicas**, que representan la expresión morfológica del proceso de transcripción y maduración de los ARN heterogéneos nucleares (ARNhn) o pre-ARNm, c) **los agregados de granulaciones intercromatínicas**, donde se ensamblan y almacenan los factores de maduración de los ARNhn, d) y **los cuerpos de Cajal** (CC), que son orgánulos nucleares involucrados en la biogénesis de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (RNPsn) y nucleolares (RNPsno; Carvalho et al., 1999; Lamond y Spector, 2003; Raska et al., 2004; Cioce y Lamond, 2005). Estas RNPsn y RNPsno se requieren para el procesamiento de los ARNhn (ARNm sin madurar y, por lo tanto, con todos sus intrones) y pre-ARNr, respectivamente (Carvalho et al., 1999; Cioce y Lamond, 2005). Existen también otros cuerpos que se han caracterizado mediante distintas técnicas como: el **dominio OPT**, el **compartimento perinucleolar**, el **cuerpo de escisión**, el **cuerpo nuclear SAM68**, el **cuerpo Polycomb**, el **cuerpo géminis**, el **cuerpo de la leucemia promielocítica** (PML: del inglés ProMyelocytic Leukemia) y los ***speckles*** y ***paraspeckels***, cuyas funciones no se conocen en profundidad, aunque se les ha asociado a los distintos procesos de procesamiento del ARNm (Huang et al., 1998; Spector, 2001; Fox et al., 2002; Misteli, 2005; Bernardi y Pandolfi, 2007; Fig.6).

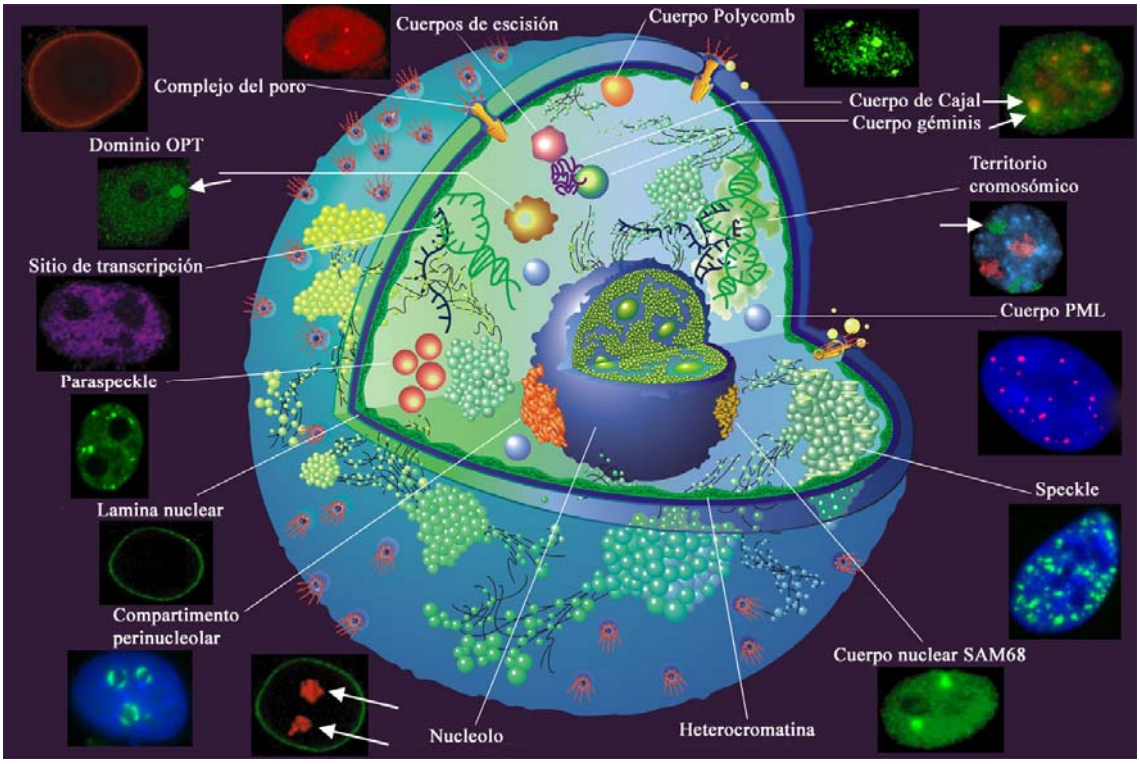

Figura 6. Compartimentación del núcleo. El núcleo celular presenta distintos compartimentos bien definidos, tanto estructural como funcionalmente. La organización de estos compartimentos es muy dinámica y refleja el estado funcional de la célula. Aquí se incluyen los territorios cromosómicos, constituidos por cromosomas interfásicos y sus dominios de eucromatina y heterocromatina, y las regiones intercromatínicas, que incluyen el nucleolo, el cuerpo de Cajal, los cuerpos PML, los speckles, los cuerpos de escisión, el cuerpo SAM68, el cuerpo Polycomb, las fibrillas pericromatínicas, o los agregados de granulaciones intercromatínicas, entre otros. Esquema modificado (Spector, 2001; Valero, 2006).

El nucleolo

El nucleolo es el orgánulo nuclear donde se transcribe el ADN ribosómico (ADNr) y donde estos transcritos son posteriormente procesados y ensamblados con proteínas ribosomales (Mélèse y Xue, 1995; Gerbi et al., 2003; Sirri et al., 2008). Estudios bioquímicos han demostrado que el nucleolo es altamente dinámico y que su estructura va estrechamente ligada a su función principal; es decir, se materializa al generar ribosomas (Mélèse y Xue, 1995). Recientemente se han propuesto otras funciones en las que está implicado el nucleolo, como la regulación de la mitosis, exportación nuclear, múltiples tipos de respuesta ante el estrés, y biogénesis y ensamblaje de distintos tipos de RNPs (Boisvert et al., 2007; Cmarko et al., 2008).

Los nucleolos se forman alrededor de porciones concretas de los cromosomas, conocidas como regiones organizadoras nucleolares (RON), que consisten en genes ribosomales, ordenados en tándem, que codifican para ARNr (Carmo-Fonseca et al., 2000; Raska, 2003; Dimario, 2004; Hernández-Verdún y Louvet, 2004; Louvet et al., 2005; Hernández-Verdún, 2006; Boisvert et al., 2007). El número de cromosomas portadores de RON es variable entre especies. En el hombre sólo cinco pares de cromosomas acrocéntricos tienen ADNr (13, 14, 15, 21 y 22), lo que indica que las células diploides pueden tener un máximo de 10 nucleolos. También el número de copias de los genes ribosomales en las RON varía

entre especies. Las células humanas diploides contienen en total 400 genes ribosomales, que tienen una alta tasa de transcripción, aunque no todos los genes codificadores de ARNr están activos (Hadjiolov, 1985; Cmarko et al., 2008). Los nucleolos son muy sensibles a cambios en el crecimiento celular y en la actividad metabólica, indicando que esta estructura recibe y responde a numerosos tipos de señalización (Boisvert et al., 2007). Durante la interfase, los genes ribosomales de más de un RON normalmente se asocian, formando el nucleolo, y el ADNr se transcribe a ARNr gracias a la ARN polimerasa I. Durante la mitosis, la síntesis de ARNr cesa como resultado de la fosforilación de distintos factores nucleares y nucleolares y el nucleolo se desensambla. En otras palabras, la nucleologénesis ocurre cuando se (re)inicia la transcripción de las RON (Dimario, 2004; Hernández-Verdún, 2006).

El complejo proceso de la biogénesis de los ribosomas ocurre en distintos compartimentos del nucleolo, fácilmente diferenciables a microscopía electrónica. Estos compartimentos son: los **centros fibrilares**, el **componente fibrilar denso** y el **componente granular** (Fig. 7). **Los centros fibrilares** son áreas redondeadas y claras constituidas por fibrillas finas de unos 300 nm de longitud (Huang, 2002; Raska, 2003; Derenzini et al., 2006). En los centros fibrilares, mediado por la ARN polimerasa I, ocurre la transcripción del ADNr. En esta región, además del ADNr se encuentran algunos pre-ARNr (sobre todo en el área cortical), el factor de unión a TATA (TBF), el factor de unión "aguas arriba" (UBF) y la ADN topoisomerasa I. Sin embargo, a pesar de concentrar la maquinaria requerida para la transcripción, no se ha demostrado que en los centros fibrilares exista transcripción del ADNr. Lo más probable es que tenga lugar en el borde entre el centro fibrilar y el componente fibrilar denso (Cheutin et al., 2002). El **componente fibrilar denso** es una región electrodensa que se localiza alrededor de los centros fibrilares. Las primeras modificaciones co-transcripcionales de los pre-ARNr (47S-45S), como metilaciones y pseudouridilaciones, tienen lugar en este compartimento nucleolar. Estas modificaciones transcripcionales las realizan las RNPsno, entre ellas la más conocida es la U3 que es esencial para la formación del ARNr 18S (Borovjagin y Gerbi, 2004; Granneman y Baserga, 2005). Además, en este compartimento nucleolar se han encontrado proteínas como la fibrilarina o la B23 (Boisvert et al., 2007). Rodeando al componente fibrilar denso se encuentra **el componente granular,** constituido por gránulos densos de 15 nm de diámetro (Strouboulis y Wolffe, 1996; Raska, 2003; Derenzini et al., 2006). La maduración final de las pre-RNPs y el ensamblaje de las proteínas ribosomales ocurren en este compartimento nucleolar. Aquí, los ARNr 28S y 5.8S se ensamblan con el ARNr 5S, sintetizado en dominios de cromatina extranucleolar, constituyéndose la subunidad ribosómica 60S (Strouboulis y Wolffe, 1996). Por otra parte, el ARNr 18S se une a la unidad ribosomal 40S. Por último, las subunidades ribosomales 40S y 60S se exportan independientemente al citoplasma, donde acaban de madurar para formar las subunidades ribosomales funcionales (Carmo-Fonseca et al., 2000; Olson et al., 2002; Raska et al., 2004; Olson y Dundr, 2005).

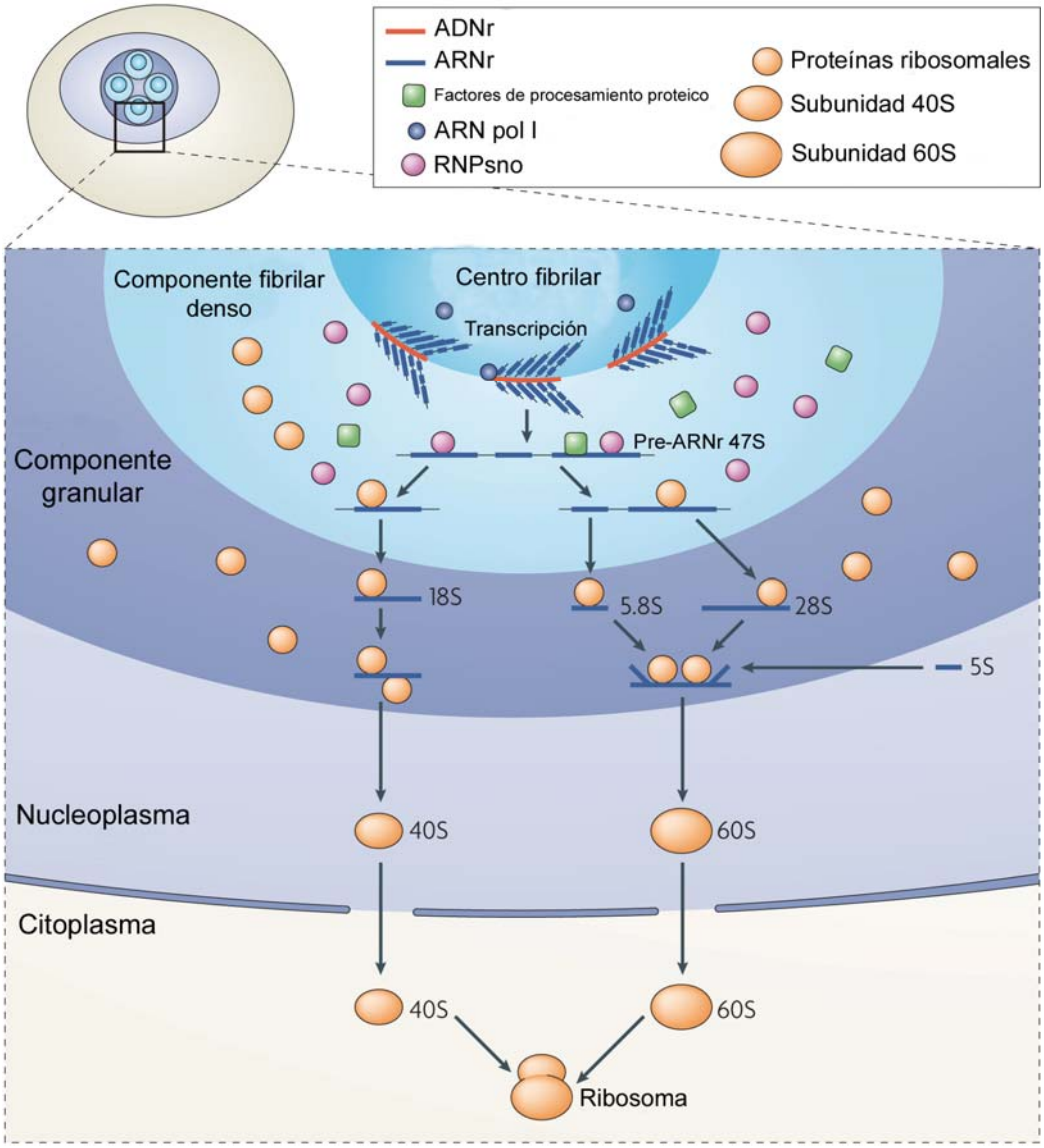

Figura 7. Esquema del proceso de biogénisis de los ribosomas. Modificado de Boisver et al., (2007)

Las fibrillas pericromatínicas

Las fibrillas pericromatínicas se sitúan en las regiones pericromatínicas. Son constituyentes estructurales ricos en RNPs, con un diámetro que varía entre 3-20 nm y que se localizan en el nucleoplasma, normalmente en los bordes de las masas de heterocromatina, aunque también se pueden observar en los dominios de eucromatina (Fakan, 1994). Representan la expresión morfológica de la transcripción de los ARNhn (Nash et al., 1975; Fakan, 1994) y su densidad está directamente relacionada con el nivel de síntesis de ARNhn (Fakan, 1994; Puvion-Dutilleul y Puvion, 1996).

Estas fibras se asocian con distintos componentes implicados en el proceso de transcripción como la ARN polimerasa II (Cmarko et al., 1999), los RNPsn (Fakan et al., 1984; Cmarko et al., 1999), el factor de *splicing* SC-35 (Spector et al., 1991; Spector, 1993) o la poli

(A)-polimerasa (Cmarko et al., 1999). La asociación a estas proteínas hace que las fibrillas pericromatínicas participen en procesos de modificación de los extremos 5' y 3' de los ARN y eliminación de los intrones mediante el proceso de *splicing* o "maduración por corte y empalme" (Spector, 1993; Lamond y Earnshaw, 1998; Proudfoot et al., 2002; Cremer et al., 2004). Este proceso está catalizado por un complejo macromolecular, el espliceosoma (o maquinaria de *splicing*), que contiene factores de *splicing* tales como los ARNsn U1, U2, U5 U4/U6, y que están asociados con proteínas del complejo Sm y proteínas de la familia reguladora del *splicing* (SR; Misteli, 2000). Para finalizar el proceso de maduración, el transcrito en crecimiento es cortado en un lugar específico próximo al extremo 3' y se le añade una cadena de poliadenina de unos 200 nucleótidos (Misteli, 2000; Proudfoot, 2000; Ares y Proudfoot, 2005).

Los agregados de granulaciones intercromatínicas

Las granulaciones intercromatínicas son áreas en las que se acumulan componentes de la maquinaria de *splicing* de los pre-ARNm. Pueden aparecer difusas por el nucleoplasma o formando agregados, pero raramente se asocian a grupos de cromatina condensada (Fakan y Puvion, 1980). Estos agregados miden entre 0.8-1.5 μm (Thiry, 1995) y están compuestos por gránulos que tienen un diámetro de unos 20 a 25 nm, que parecen estar conectados por una sutil red de fibrillas de unos 10 nm (Thiry, 1995). En estos agregados no hay ADN, o es muy escaso, y son muy resistentes a las nucleasas (Monneron y Bernhard, 1969; Spector et al., 1983, 1991).

Los agregados no son sitios de transcripción activa, ni sitios de acumulación de ARN (Spector, 1993; Cmarko et al., 1999); sin embargo, los factores de *splicing* son reclutados desde estos agregados y dirigidos hasta los sitios de transcripción activa. Se ha demostrado que la distribución de los factores de *splicing* se acomoda a los distintos requerimientos funcionales de las células y está relacionada con la actividad transcripcional (Lafarga et al., 1998; Pena et al., 2001; Navascués et al., 2004b). Además, aunque la transcripción no tiene lugar en los agregados de granulaciones intercromatínicas, puesto que carecen de ADN (Thiry, 1995; Spector et al., 1983; Cmarko et al., 1999), sí que concentran la subunidad grande de la forma fosforilada de la ARN polimerasa II (Sacco-Bubulya y Spector, 2002).

El cuerpo de Cajal

Los CC fueron descubiertos por Ramón y Cajal (1903) en neuronas de mamíferos. Es una estructura que se encuentra tanto en células vegetales como animales; su tamaño y número depende del tipo celular, de la fase del ciclo y de la actividad transcripcional (Lafarga et al., 1991, 2009; Pena et al., 2001; Ciace y Lamond, 2005; Berciano et al., 2007). Estos orgánulos nucleares contienen factores de *splicing* determinados, la proteína p80 coilina (Andrade et al., 1991), RNPsn y la proteína de supervivencia de motoneuronas (SMN; Matera y Frey, 1998; Carvalho et al., 1999; Gall, 2000). Además, el CC contiene las proteínas fibrilarina y Nopp140, algunos RNPsno (Raska et al., 1990; Cioce y Lamond, 2005), y va-

rias quinasas y factores de transcripción (Gall, 2000, 2001). Los CC intervienen en la biogénesis de los factores ribonucleoproteicos que se requieren para el procesamiento de los pre-ARNm y pre-ARNr, respectivamente, y que tiene lugar en las fibrillas pericromatínicas (Gall, 2000; Carmo-Fonseca, 2002; Cioce y Lamond, 2005).

El CC se ha podido estudiar en profundidad gracias a la identificación de un marcador molecular específico, la proteína p80 Coilina (Andrade et al., 1991). Diversos estudios han demostrado la acumulación en el CC de los factores U RNPsn implicados en el *splicing* de los pre-ARNm (Carmo-Fonseca et al., 1992; 1993; Huang y Spector, 1992; Matera y Ward, 1993). Además, también se encuentra en el CC el complejo multiproteico Sm y otras proteínas asociadas a ARNsn específicos, como la U2B", que interacciona con el ARNsn U2 (Carmo-Fonseca et al., 1992; Beven et al., 1995). El CC concentra SMN, que está relacionada con la biogénesis de las RNPsn en el citoplasma y la translocación de estas RNPsn a los CC antes de que sean transferidas a los gránulos intercromatínicos (Morris, 2008). A pesar de que el CC concentra una gran variedad de componentes de la maquinaria de *splicing* no es un sitio de transcripción ni de *splicing* (Lamond y Carmo-Fonseca, 1993; Bohmann et al., 1995; Gama-Carvalho et al., 1997). Sin embargo, el CC tampoco es un mero sitio de almacenaje de RNPsn, puesto que es un compartimento nuclear altamente dinámico, se desensambla durante la mitosis y su reformación en la fase temprana del G1 es dependiente de la actividad transcripcional de la célula (Carmo-Fonseca et al., 1992; Lafarga et al., 1998; Pena et al., 2001; Navascués et al., 2004a). De hecho, la coilina de los CC puede sumoilizarse en procesos de diferenciación neuronal o de respuesta al estrés (Navascués et al., 2008). También se ha caracterizado una nueva familia de ARN nucleares de pequeño tamaño que se localizan en el CC y que se han llamado ARN pequeños del CC (ARNsca; Cioce y Lamond, 2005). Estos ARNsca catalizan procesos de maduración de los ARNsn espliceosomales (Darzacq et al., 2002). Además, en el CC las RNPsn sufren dos modificaciones esenciales para su maduración: la metilación de múltiples residuos de ribosas y la conversión de uridinas en pseudouridinas. Estos procesos parecen estar catalizados por los ARNsca (Carmo-Fonseca, 2002; Darzacq et al., 2002; Cioce y Lamond, 2005). Además, se piensa que el CC puede estar relacionado con el ensamblaje y maduración del ARN de la telomerasa (Jády et al., 2004). Como ya hemos dicho, la dinámica del CC es altamente dependiente de la actividad transcripcional (Lafarga et al., 1991; 1998; Lamond y Carmo-Fonseca, 1993). Por ejemplo, cuando se somete a las células a ciertos tipos de estrés, que desencadenan una inhibición severa de la transcripción, se ha podido observar una gran reducción en el número de CC (Lafarga et al., 1998). Además de existir un descenso en el número de CC en procesos de represión transcripcional, también se pueden detectar modificaciones morfológicas de esta estructura. De hecho, la coilina (proteína específica de los CC) se relocaliza formando casquetes perinucleolares en procesos donde existe inhibición de la transcripción (Valero et al., 2006). La coilina es esencial para la integridad y la función de los CC (Morris, 2008). Sin coilina, los CC se conocen como CC residuales y son incapaces de reclutar los RNPsn (Tücker et al., 2001; Jády et al., 2003). Sin embargo, sorprenden-

temente, ni la coilina ni los CC parecen ser esenciales en el proceso de *splicing*, ya que ratones coilin-/- sobreviven (Tücker et al., 2001) aunque su falta disminuye la eficiencia del *splicing* (Klingauf et al., 2006). De esta manera, la asociación de los componentes del CC con el nucleolo depende del requerimiento celular de factores de *splicing*, que a su vez depende de la actividad metabólica de las neuronas (Lafarga et al., 1998; Berciano et al., 2002; Navascués et al., 2004b; Morris, 2008). Puesto que las CP presentan una alta tasa de actividad transcripcional y una elevada actividad metabólica, en el presente trabajo de Tesis Doctoral analizaremos el patrón neuroquímico y morfológico de este orgánulo nuclear en las CP del los ratones control y los ratones mutantes PCD a distintas edades de la etapa preneurodegenerativa y neurodegenerativa.

Mecanismos de señalización de daño y reparación del ADN

Todos los tipos celulares son susceptibles de sufrir daño en su material genético. Estas lesiones se pueden originar de forma endógena durante la actividad fisiológica de la célula, en procesos como la proliferación o el metabolismo celular. Estas alteraciones pueden formarse también por la acción de agentes exógenos, como la radiación ionizante. Estas lesiones dañan el ADN y pueden alterar drásticamente los procesos de replicación, transcripción y/o traducción de proteínas. El mantenimiento de la integridad genómica durante el proceso de reparación del ADN es esencial para el correcto funcionamiento, supervivencia y continuidad de los tejidos. Por ello, las células eucariotas han desarrollado mecanismos que detectan la presencia de daños en el ADN e inician una respuesta coordinada ante este daño.

Dependiendo del tipo de lesión, se desarrollan distintas estrategias de reparación para recuperar la información perdida. Esta respuesta incluye la reparación del ADN al menos por dos vías distintas (por medio de recombinación homóloga o por unión de extremos de ADN no homólogos), aunque también existe una respuesta denominada de "punto de control", que puede llevar a la muerte celular programada (Melo y Toczyski, 2002; Shiloh, 2003a, b; Iijima et al., 2008). En la reparación del ADN actúan proteínas sensoras, mediadoras y efectoras, que sufren o producen modificaciones postraduccionales como fosforilaciones y acetilaciones. La aparición de roturas en la estructura del ADN incluye cambios en la actividad de diversas moléculas: la proteína mutada en la ataxia telangiectasia (ATM), la proteína relacionada con ATM y Rad3 (ATR) y la proteína-quinasa dependiente de ADN (PK-ADN), entre otras (Kurz y Lees-Miller, 2004).

La secuencia de acontecimientos que tiene lugar en la célula tras la lesión en el ADN está recogida en la figura 8. En respuesta al daño en la doble cadena de ADN tienen lugar simultáneamente distintos eventos encargados de señalizar el sitio de rotura y promover la reparación. ATM se encuentra en su forma estándar formado un complejo dimérico inacti-

vo. En respuesta al daño en el ADN, ATM se autofosforila pasando a su forma monomérica activa. La variante de histona H2AX, que se encuentra en la cromatina, se fosforila y sirve como punto de anclaje para los factores de reparación. El complejo **M**re11-**R**ad50-**N**bs1 (complejo MRN) se localiza en la zona de lesión del ADN junto con la proteína BRCA1 (D'Amours y Jackson, 2002; Petrini y Stracker, 2003; van den Bosch et al., 2003; McGowan y Russell, 2004). Este complejo permite que la pATM se reclute mejor en el lugar de rotura y que la fosforilación de los sustratos, por parte de pATM, sea más eficiente (Lee y Paull, 2007). La formación de este complejo multiproteico facilita la respuesta celular al daño en la doble cadena de ADN.

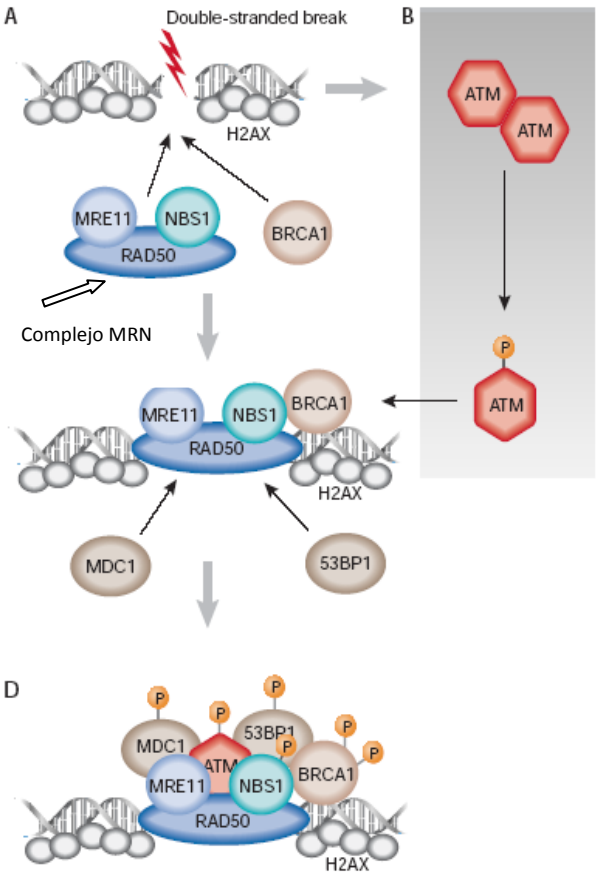

Figura 8. Esquema de los factores implicados en los mecanismos de señalización/reparación del ADN. (A) En el momento que se produce la rotura del ADN la H2AX señaliza el foco donde se produce la lesión. (B) ATM (forma dimérica) se fosforila y pasa a forma monomérica. (C) En el foco de rotura se sitúan las proteínas del complejo MRN o la 53BP1, entre otras. (D) Se forma un complejo multiproteico implicado en la reparación del ADN. Modificado de McKinnon, 2004.

Además, otras proteínas sensoras del daño como ATR y la PK-ADN fosforilan también a las moléculas de H2AX que se encuentran alrededor de las regiones en las que se ha producido la rotura de la doble cadena de ADN (Ward y Chen, 2001). Más aún, las modificaciones postraduccionales que realizan las proteínas sensoras sobre proteínas mediadoras como BRCA1, MDCL, o la proteína 1 de unión a p53 (53BP1) son esenciales para amplificar la señalización del daño del ADN (Kobayashi et al., 2008). Algunas proteínas mediadoras de la señal también pueden actuar como señalizadoras del daño, por ejemplo, la 53BP1 detecta cambios conformacionales en la estructura de la cromatina, respondiendo después -e incluso antes- de que se produzca la activación de ATM y localizándose en las regiones de daño en la doble cadena de ADN (Anderson et al., 2001; Huyen et al., 2004; Pryde et al., 2005). Por otro lado, γ-H2AX es esencial para el reclutamiento en el lugar del daño de las proteínas implicadas en la señalización y la reparación de la rotura del ADN. Además, γ-H2AX parece tener también un papel en la inducción de cambios estructurales en la cromatina cuando se produce daño en el ADN (Fernández-Capetillo et al., 2004; Jin et al., 2005; Lydall y Whitehall, 2005). Finalmente, las proteínas mediadoras transmiten la señal a proteínas efectoras como RAD51, Artemis,

Chk2 ó p53, que forman parte del mecanismo reparador del foco de rotura del ADN (Kobayashi et al., 2008).

Por lo tanto, numerosos complejos proteícos son activados y modificados ante la aparición de lesiones en el ADN. Cualquier fallo en alguno de los numerosos pasos que suceden durante este proceso sería fatal para la supervivencia de la célula afectada.

Como antes señalamos, dependiendo de las características de la lesión de la doble cadena de ADN y de las condiciones de la célula, la reparación del daño se puede realizar principalmente mediante dos sistemas, por unión de extremos de ADN no homólogos o por recombinación homóloga (Fig. 8). Ambos mecanismos de reparación permiten mantener la integridad del ADN tras una lesión del mismo; sin embargo, las rutas bioquímicas que siguen son diferentes. La recombinación homóloga ocurre sobre todo en células proliferativas, mientras que el sistema de unión de extremos de ADN no homólogos ocurre tanto en células proliferativas como en células ya diferenciadas (McKinnon, 2009).

La unión de extremos no homólogos es la vía de reparación que liga los 2 extremos dañados de una misma hebra (Fig. 9). Es una respuesta que ocurre rápidamente y la que más potencial de reparación tiene, ya que posee la capacidad de unir los extremos dañados del ADN sin la necesidad de secuencias homólogas (Wilson et al., 1997). Ello supone que mediante este sistema de reparación se produzcan normalmente pequeñas inserciones o delecciones. En esta vía de reparación intervienen diversas proteínas como la PK-ADN, el heterodímero Ku70/80, Artemis, el complejo XRCC4/ADN ligasa IV o la proteína XLF (van Gent y van der Burg, 2007). Aunque este sistema repara eficientemente el foco de rotura, normalmente conlleva una pérdida de la información genética.

Por otro lado, la **recombinación homóloga** es un proceso libre de errores que utiliza la cromátida hermana como molde para llevar a cabo una reparación precisa (Fig. 9; Helleday et al., 2007). Este proceso requiere la participación de numerosos factores (Sun et al., 1991). El primer paso consiste en realizar un corte al final del foco de rotura con el fin de generar extremos 3' libre. Esta modificación la puede realizar el complejo MRN, Exo1, o algún tipo de nucleasas (Llorente y Symington, 2004). A continuación, RPA (del inglés: *Replication Protein **A***) se une al extremo 3' para preservar la estructura secundaria del ADN, e inmediatamente se sustituye por distintos complejos proteicos (entre los cuales se encuentra RAD51) que utilizan la cromátida hermana como molde para sintetizar el foco de rotura dañado. Aunque se ha demostrado la implicación de pATM en la fosforilación de numerosos factores que intervienen en este mecanismo de reparación, la función exacta de esta proteína durante la regulación de este proceso aún se desconoce. Inicialmente se propuso que ATM era esencial para el comienzo de este mecanismo de reparación (Golding et al., 2004). Sin embargo, estudios con células donde la expresión de ATM estaba reprimida demostraron que el proceso de recombinación homólogo ocurría con normalidad y eficacia (Bolderson et al., 2004).

El conocimiento acerca de los sistemas de reparación del ADN ha avanzado notablemente. Se conocen los genes implicados e incluso las rutas enzimáticas en las que participan las numerosas proteínas involucradas en la reparación. Sin embargo, aún quedan algunas cuestiones importantes que deben de ser investigadas, como la función de la cromatina durante la reparación del ADN, la localización celular donde ocurren las reacciones de reparación y su conexión con otras funciones metabólicas nucleares así como la importancia de la reparación en la proliferación y diferenciación, además de su función en el origen del cáncer y otros síndromes genéticos.

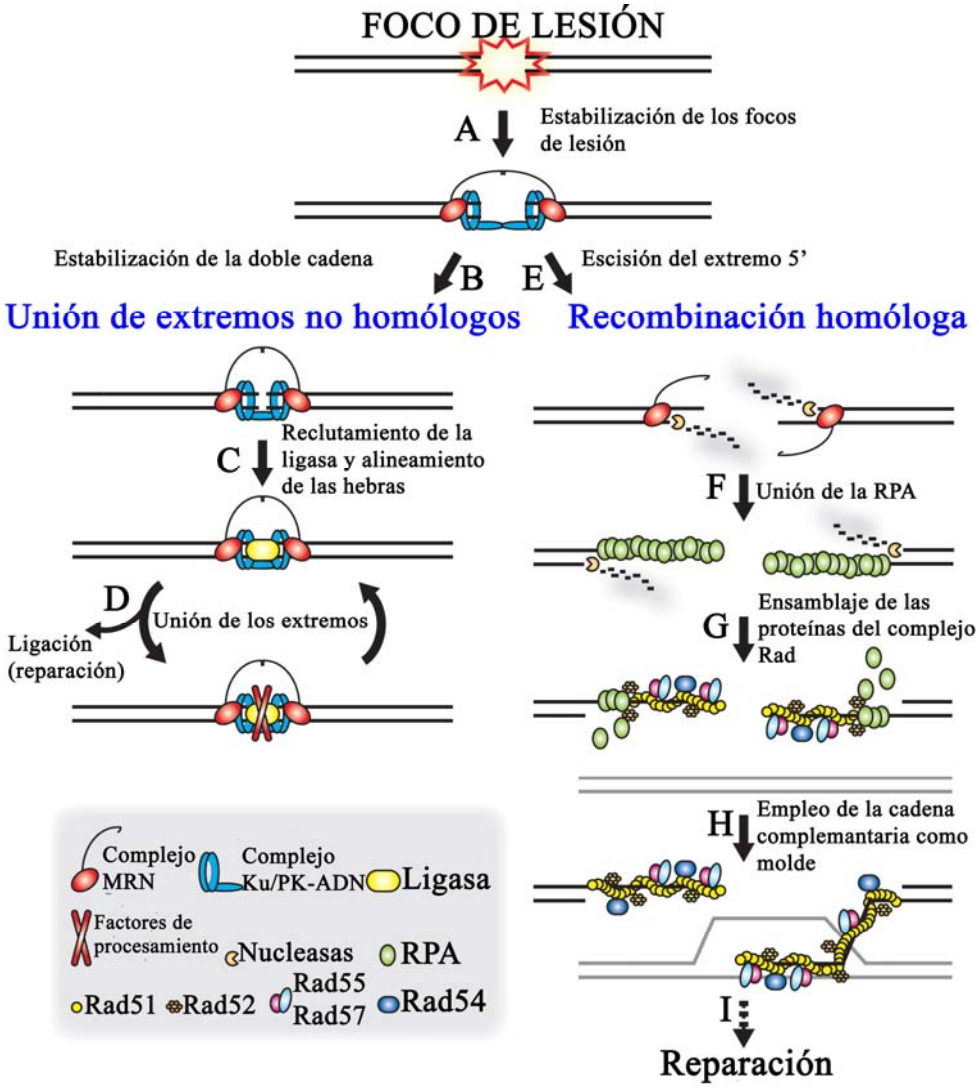

Figura 9. **Modelo de reparación del ADN por las vías de unión de extremos no homólogos y por recombinación homóloga**. (A) Una vez producida la lesión, los extremos del foco de rotura son estabilizados por el complejo MRN y el complejo Ku/PK-ADN. (B) En la vía de unión de extremos no homólogos, los extremos del foco de lesión deben ser aún más estabilizados por los mismos complejos proteicos. (C) El complejo MRN y Ku/PK-ADN reclutan el complejo de la ligasa. Además, se alinean las hebras que se van a unir. (D) Unión de los extremos catalizado por la ligasa. (E) En la recombinación homóloga, el extremo 5' se elimina por distintas nucleasas. (F) La RPA se une a los extremos 3' generados por la eliminación del extremo 5'. (G) La RPA unida a las hebras de ADN suponen un sustrato para la unión de distintas proteínas Rad. (H) Utilización de la cromátida hermana, no dañada, como molde. (I) Reparación del foco de rotura. Esquema modificado (Pardo et al., 2009).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades degenerativas del sistema nervioso engloban patologías diversas, con incidencias, etiologías, y componentes genéticos diferentes. Todas tienen en común la pérdida de elementos neurales que, como consecuencia, provocan alteraciones neurológicas graves. La mayoría de estas enfermedades son progresivas y terminan con la muerte de los pacientes ante la imposibilidad de realizar funciones neuro-orgánicas básicas. La mayoría de los estudios realizados se centran en las consecuencias que suceden en el organismo ante la falta de un determinado tipo neuronal. Sin embargo, apenas se presta atención a aquellos procesos que tienen lugar en la neurona afectada en las etapas previas a su muerte. Un mayor conocimiento de estos eventos patológicos previos podría suponer un avance en el desarrollo de nuevas terapias preventivas ante la muerte neuronal, así como en un mejor y más temprano diagnóstico.

En la presente Tesis Doctoral planteamos el análisis de los procesos que preceden y conducen a la degeneración de un tipo neuronal muy concreto, las CP del cerebelo. La pérdida de este tipo neuronal provoca ataxia cerebelosa, un signo patológico muy común en enfermedades humanas como la ataxia telangiectasia. Para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos utilizado un modelo animal, el ratón mutante PCD (***P****urkinje* ***C****ell* ***D****egeneration*) que porta una mutación autosómica y recesiva en el gen *nna1* que provoca degeneración posnatal de las células mitrales del BO, los fotorreceptores de la retina y las CP del cerebelo, entre otras. En nuestro estudio analizaremos diferentes alteraciones que ocurren en las etapas iniciales de la degeneración (estadio pre-neurodegenerativo) y que desencadenan la muerte neuronal, concretamente de las CP. Además, compararemos el patrón pre-neurodegenerativo y neurodegenerativo de las CP con el que exhiben las células mitrales durante su degeneración, puesto que la existencia de diferencias en el patrón de muerte pudiera explicar las causas por las que las células mitrales degeneran más tarde y su proceso es más lento que el de las CP.

El **objetivo general** de esta Tesis Doctoral es el estudio de mecanismos que desencadenan la degeneración de las células de Purkinje en un modelo animal de ataxia cerebelosa, el ratón mutante PCD. Además, discutiremos la posible función del gen afectado en la mutación pcd, el gen *nna1*.

La **hipótesis general** de este trabajo es que "*La mutación pcd que origina la desaparición selectiva de las células de Purkinje produce eventos patológicos previos a la muerte neuronal que tienen como consecuencia una disfunción celular temprana*".

Objetivos concretos

1. Analizar la degeneración de las células de Purkinje del ratón mutante PCD utilizando marcadores inmunohistoquímicos específicos para estas neuronas, y comprobar si su muerte se corresponde con modelos de apoptosis o necrosis.
2. Determinar la capacidad motora de los ratones mutantes PCD en la etapa pre-neurodegenerativa mediante el *test* del Rota-rod.
3. Estudiar mediante PCR a tiempo real el nivel de expresión del gen *nna1* en el cerebelo de animales control de distintas edades (P10-P80). Comparar esos datos con los que se observan en el bulbo olfatorio, otra región con expresión del gen *nna1*.
4. Realizar un análisis de expresión génica global del cerebelo de ratones PCD durante la etapa pre-neurodegenerativa y compararlo con ratones control mediante hibridación de *microarrays*.
5. Estudiar las alteraciones citopatológicas (citoplasmáticas, axonales y dendríticas) de las células de Purkinje del ratón mutante PCD durante el periodo pre-neurodegenerativo y neurodegenerativo.
6. Valorar la presencia de lesiones en el ADN nuclear de las células de Purkinje del ratón PCD mediante el análisis inmunocitoquímico de proteínas implicadas en los mecanismos de señalización y reparación del mismo.
7. Analizar el nivel de actividad transcripcional de las células de Purkinje de los animales PCD así como los compartimentos nucleares implicados en procesos de *splicing* y de degradación proteica mediante inmunocitoquímica, hibridación *in situ* y microscopía electrónica.
8. Estudiar el nivel de estrés oxidativo en la corteza cerebelosa del ratón PCD y compararlo con el del animal control.
9. Determinar posibles alteraciones histopatológicas en la glía de la corteza cerebelosa durante el proceso degenerativo de las células de Purkinje. Para ello emplearemos marcadores inmunohistoquímicos específicos de las distintas poblaciones gliales y microscopía electrónica. Más aún, analizaremos si esta respuesta glial es similar durante la degeneración de las células mitrales del bulbo olfatorio en el mismo modelo de ratón.
10. Analizar la posible función de Nna1 como tubulina carboxipeptidasa estudiando la expresión de la tubulina en el cerebelo de ratones control y PCD durante las etapas pre-neurodegenerativa y neurodegenerativa.
11. Como objetivo metodológico proponemos el desarrollo de un anticuerpo específico contra la proteína Nna1 del ratón.

Con todo ello, los objetivos que nos hemos planteado en el presente trabajo de Tesis Doctoral persiguen determinar qué alteraciones ocurren en las etapas previas a la muerte de la célula de Purkinje suponiendo un avance en el estudio de las enfermedades degenerativas.

Material y Métodos

En esta sección explicaremos detalladamente la metodología empleada en la Tesis Doctoral. En este trabajo hemos desarrollado las siguientes técnicas: a) de Biología Molecular: PCR, PCR a tiempo real, hibridación de *microarrays*, *western-blot*; b) de Histología: disociados tisulares, secciones histológicas por congelación y parafina, inmunohistoquímica, inmunocitoquímica, microscopía electrónica, hibridación *in situ*; y c) de fisiología del control motor (Rota-rod).

Describiremos detalladamente el mantenimiento y manejo de los animales de experimentación empleados. El genotipado de estos animales (necesario para la discriminación entre animales homocigotos y heterocigotos) fue realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para diferenciación de secuencias microsatélites polimórficas.

El nivel de expresión génica global del vermis del cerebelo de ratones control y PCD se analizó mediante hibridación de *microarrays*, mientras que para estudiar específicamente el grado de expresión del gen *nna1* empleamos la PCR a tiempo real, tanto en el cerebelo como en el BO. La técnica de *western-blot* se utilizó para comparar el grado de nitrosilación de proteínas entre animales control y mutantes PCD y determinar así el grado de estrés oxidativo. Además, realizamos el análisis necesario para el desarrollo de un anticuerpo policlonal contra la proteína Nna1.

Las técnicas histológicas permitieron estudiar el patrón de expresión de numerosas proteínas en distintos tipos neurales (de la corteza cerebelosa y el BO), así como la estructura y ultraestructura de ciertos tipos celulares, principalmente CP y células gliales de la corteza cerebelosa. La técnica de TUNEL permitió identificar células apoptóticas. Además, la hibridación *in situ* para ADN telomérico y la cadena de Poli(A) proporcionaron datos acerca de la estabilidad genómica y de la distribución del ARNm, respectivamente.

Finalmente, la habilidad motora de los animales se evaluó con la técnica de Rota-rod.

Animal de experimentación

El modelo animal utilizado durante el presente trabajo de Tesis Doctoral fue el ratón (*Mus musculus* L. 1758), obtenido del cruce entre las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, ambas procedentes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, EE.UU.). De esta manera se obtuvieron ratones C57BL/DBA.

Los animales se criaron y mantuvieron en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca a temperatura y humedad relativa constantes, fotoperiodo artificial de 12 horas y alimentados *ad limitum* con H_2O y pienso compuesto para roedores (T2014 Teklad Global 14% Protein Rodent Diet, Oxon, Reino Unido).

El protocolo de mantenimiento, manejo y sacrificio de los animales cumplió con la actual normativa europea (86/609/EEC) y legislación española (RD 1201/2005). Además, los procedimientos que se han empleado fueron previamente aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca.

Genotipado de los animales

A edades tempranas (previas a P15) los ratones control (+/+) son fenotípicamente indistinguibles tanto de los heterocigotos (+/pcd) como de los homocigotos para la mutación (pcd/pcd). Para la identificación del genotipo de los animales de experimentación se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR. del inglés *Polymerase Chain Reaction*).

Se ha propuesto que la mutación se encuentra en la secuencia reguladora del gen *nna1* (Fernández-González et al., 2002); sin embargo, la localización exacta no se ha identificado. Para poder desarrollar el genotipado se cruzaron ratones machos de la estirpe C57BL/6J heterocigotos para la mutación pcd con hembras control (+/+) de la estirpe DBA/2J. Estos cruces permitieron asociar el alelo pcd al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo normal se asoció al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe DBA/2J. Esta segregación diferencial de alelos es la que permitió identificar genéticamente a los animales.

Para ello se eligieron como marcadores dos regiones microsatélite presentes tanto en la estirpe C57BL/6J, portadora de la mutación, como en la estirpe DBA. Los microsatélites debían ser polimórficos entre ambas estirpes, con un tamaño en número de pares de bases (pb) lo suficientemente diferente entre las dos estirpes como para distinguirlos en un gel de agarosa mediante electroforesis. Dichos fragmentos debían estar, además, lo suficientemente cercanos al gen portador de la mutación pcd como para presuponer su transmisión ligada en una elevada probabilidad, de tal manera que pudiésemos considerar como hipótesis fiable la no existencia de recombinación entre el gen y el marcador.

Escogimos los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283. El primero es un fragmento de 130 pb en los ratones de la estirpe C57BL/6J y de 116 pb en la estirpe DBA/2J. El segundo es un fragmento de 114 pb y 136 pb en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, respectivamente. Se utilizaron ambos marcadores para asegurarnos de que a lo largo de las generaciones su localización no se veía afectada por fenómenos de recombinación.

Extracción de ADN

El ADN genómico de los ratones de edades inferiores a P10 se obtuvo a partir de tejido de la cola. Para la obtención del ADN las colas se homogeneizaron a 55 ºC durante una noche en un tampón que contenía: proteinasa K (6 U/ml, Sigma-Aldrich, EE.UU.), dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés: *Sodium Dodecyl Sulphate*) al 20% (v/v), EDTA (del iglés: *Ethylene Diamine Tetracetic Acid*) 0.5 M pH 8.0, NaCl 5 M, Tampón Tris 1 M pH 8 y H_2O Mili-Q. Posteriormente, las colas se centrifugaron a 13.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 2 min. Se recogió el sobrenadante y el ADN se precipitó con un volumen de isopropanol, centrifugando las muestras después (10 min) a 13.200 rpm. Por último, el pellet de ADN se lavó con etanol 70% (v/v) a 4 ºC, se centrifugó de nuevo durante 10 min, se dejó secar y se resuspendió en 50 µl de H_2O Mili-Q.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN determinado a partir de muy poca cantidad de ADN original, en un corto periodo de tiempo (Mullis et al., 1986). Se puso a punto un protocolo para la realización de la PCR con los marcadores: D13Mit250 y D13Mit283 (Laboratorios Jackson: http://www.informatics. jax.org/searches/probe.cgi?38700 y http://www.informatics.jax.org/searches/probe.cgi? 41581. Los cebadores, así como los ciclos de temperatura, se detallan en las tablas 2 y 3, respectivamente.

El medio para la realización de la PCR contenía: tampón comercial de la Taq polimerasa (5X, Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), desoxinucleótidos trifosfato (0.2 mM, Promega), Taq polimerasa (0.013 U/µl, Promega), dimetilsulfóxido (DMSO; 5%), MgCl2 (1.5 mM), cebadores (5 µM), ADN (entre 100 y 500 ng de muestra) y H_2O Mili-Q. En la tabla 2 se recogen las secuencias de los dos cebadores correspondientes a cada uno de los dos marcadores.

Tabla 2. Cebadores empleados para la amplificación de las regiones D13Mit250 y D13Mit283.

Marcador D13Mit250	Secuencia	Marcador D13Mit283	Secuencia
Cebador 1	5'-ACACTCATTTCC ATGCACGA-3'	Cebador 1	5'-GGAAGCAGT CTCCTGCCTC-3'
Cebador 2	5'-AGGTCCTCAAAT CTCACAAGTAGG-3'	Cebador 2	5'-GAGAGGTGG CACATGAGGTT-3'

Como control positivo se incluyó siempre una muestra de ADN de cada uno de los tres genotipos posibles (+/+, +/pcd y pcd/pcd), mientras que como control negativo se utilizó el medio anterior sustituyendo el volumen de ADN por H_2O Mili-Q. La PCR de ambos marcadores se realizó en un termociclador (Primus, MWG- Biotech, Vernon Hills, Illinois, EE. UU) con los ciclos de temperatura que se detallan en la tabla 3:

Tabla 3. Condiciones de tiempo y temperatura de la PCR para genotipar la mutación pcd.

Paso	Tiempo	Temperatura D13Mit250		Temperatura D13Mit283	
1	5 min	94 °C		94 °C	
2	1 min	94 °C		94 °C	
3	1 min	54 °C	x40	53 °C	x40
4	1 min 30 s	72 °C		72 °C	
5	10 min	72 °C		72 °C	
6	∞	4 °C		4 °C	

Electroforesis

Los productos de la PCR de las regiones microsatélites D13Mit250 y D13Mit283, que tienen distintos tamaños en las estirpes C57BL/6J y DBA/2J, se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa (MS-8, Pronadisa, Madrid, España) al 3% (p/v) en tampón Tris-borato-EDTA (TBE) 0.5X (ver Apéndice). Al gel se añaden 0.4 µg/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich) para la visualización de las distintas bandas del ADN amplificado, observándolo bajo una lámpara de luz ultravioleta (Gel Doc XR, BioRad Laboratories, Barcelona, España). El marcador de peso molecular empleado fue el *pBR322 DNA-Msp I Digest* (New England BioLabs, Ipswich, Massachusetts, EE.UU.). Los carriles donde aparecían dos bandas de diferente tamaño (bien de 130 y 116 pb para el D13Mit250, o bien de 114 y 136 pb para el D13Mit283), se correspondían con animales heterocigotos (+/pcd), mientras que en los que aparecía una sola banda de mayor grosor (bien de 116 pb para el D13Mit250, o de 136 pb para el D13Mit283), se correspondían con animales homocigotos controles (+/+). Por último, los carriles en los que aparecía una banda de 130 pb para el D13Mit250 o de 114 pb para el D13Mit283 se correspondían con animales homocigotos mutantes (pcd/pcd).

Técnicas de Biología Molecular

Hibridación de Microarrays

La hibridación de *microarrays* permite el análisis de los niveles de expresión de ARNm en el cerebelo (en concreto el vermis) de ratones mutantes PCD, comparándolos con los del control. Esta metodología nos permite obtener una visión global del estado de nivel transcripcional de los genes del ratón y compararlo con el del grupo experimental, en este

caso el ratón mutante PCD. Para ello, se aisló el ARN total de 3 ratones control y 3 ratones mutantes PCD de P20 y se amplificó el ARNm mediante hibridación en micromatrices (*microarrays*).

Extracción del ARN total

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se extrajo rápidamente el cerebelo en una zona estéril para evitar contaminaciones. Seguidamente, se homogeneizó el tejido con el Poly-tron (PT2100, Kinematica AG, Littau, Suiza) en 700 µl de TRIzol y se dejó reposar durante 5 min a TA. Posteriormente, se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó durante 15 min a 12.000 *g*. A continuación, se recogió la fase acuosa y se transfirió a un eppendorf estéril, donde se añadieron 500 µl de isopropanol, mezclándolo bien para conseguir precipitar el ARN. Se dejó reposar a TA (10 min) y posteriormente se centrifugó a 4 ºC durante 20 min, a una velocidad de 11.000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, y se lavó el *pellet* con 1 ml de etanol frío (-20 ºC) al 75% (v/v). De nuevo, se centrifugó (5 min) a 4 ºC y a una velocidad de 8.500 rpm. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar el *pellet* de ARN y se resuspendió en un volumen de 30 µl de H_2O_{DEPC} (H_2O destilada que se trató previamente durante 12 h con 500 µl/l de dietilpirocarbonato (Sigma), que posteriormente se autoclavó). El ARN fue purificado mediante columnas QIAGEN (RNeasy mini-kit, Cat. Nº 74104, Qiagen Iberia, Madrid). Por último, el ARN resultante se almacenó a -80 ºC hasta se utilización. Durante todo este proceso se utilizó material esterilizado previamente en el autoclave.

Análisis de la expresión génica

Se utilizaron 5 µl de ARN total para el análisis del nivel de expresión génica diferencial, entre el cerebelo del ratón mutante PCD y el control. Previo a la hibridación de los *microarrays*, se analizó la pureza y la concentración del ARN total mediante el sistema Agilent Bioanalyzer. Una vez comprobado que estas variables eran las adecuadas, se realizó la hibridación en una micromatriz específica de genoma total del ratón (Gene Chip Mouse Genome 430 2.0; High Wycombe, Reino Unido). Este último paso se realizó en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (Universidad de Salamanca). Los resultados obtenidos en los *microarrays* fueron posteriormente analizados en colaboración con el Servicio de Bioinformática de dicho centro.

Análisis estadístico

El estudio estadístico de los *microarrays* se realizó mediante un análisis de expresión diferencial entre las muestras de los ratones control y las muestras de los ratones mutantes PCD. El cálculo de la señal se hizo mediante el algoritmo RMA (Robust Microarray Analysis; Irizarry et al., 2003) y el cálculo de expresión diferencial mediante SAM (Significance Analysis of Microarrays; Tusher et al., 2001) que incluye una estimación del error mediante FDR (False Discovery Rate; Benjamini et al., 2001).

PCR a tiempo real

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos analizado mediante PCR a tiempo real el nivel de expresión génica de los transcritos sintetizados a partir del gen *nna1*, tanto en el BO como en el vermis del cerebelo. Este análisis lo realizamos en animales control de 10, 15, 20, 25, 50, 60, 70 y 80 días de edad posnatal. Para ello obtuvimos el ARN siguiendo el mismo protocolo que hemos descrito en el apartado anterior ("Hibridación de *microarrays*"). Se analizó la pureza y la concentración del ARN total mediante el sistema Agilent Bioanalyzer. A continuación, a partir del ARN aislado, procedimos a sintetizar el ADN copia (ADNc) correspondiente mediante el proceso de la retrotranscripción.

Retrotranscripción

El proceso de retrotranscripción se realizó utilizando el kit ImPromII™ Reverse transcription System (Promega). Este proceso se llevó a cabo en dos pasos. En el paso 1 se mezcló 1 µg de ARN de cada muestra con 1 µl de hexámeros de secuencias al azar (como cebadores) y H_2O Mili-Q, hasta un volumen final de 5 µl por muestra. A continuación, en un primer paso (ver tabla) se sometió cada muestra a un ciclo de 70 ºC durante 5 min en el termociclador (Primus, MWG- Biotech, Vernon Hills, Illinois, EE. UU.). Posteriormente (paso 2) se añadió a cada muestra 15 µl de un medio que contenía:

H_2O Mili-Q (6.1 µl)

$MgCl_2$ (25 mM; 2.4 µl)

Inhibidor de nucleasas (1 U/µl; 0.5 µl)

Desoxinucleótidos trifosfato (10 mM; 1 µl)

Tampón ImpromII 5X (4 µl)

Transcriptasa inversa (1 µl)

Los ciclos de temperatura y los tiempos de cada ciclo a los que se realizó el proceso de retrotranscripción se detallan en la siguiente tabla:

Paso	Tiempo	Temperatura	Función
1	5 min	70 ºC	Desnaturalización de cebadores y ARN
2	5 min	4 ºC	Preservación del ARN durante la adición del medio
	5 min	25 ºC	Anillamiento de los cebadores al ARN
	1 hora	42 ºC	Extensión de la cadena
	15 min	70 ºC	Inactivación de la transcriptasa inversa
	∞	4 ºC	Mantenimiento del ADNc

Finalmente, en cada muestra, a partir de 1 µg de ARN se obtuvo una concentración final de 50 ng/µl de ADNc en un volumen final de 20 µl.

PCR cuantitativa en tiempo real

Una vez aislado el ADNc de cada una de las muestras, medimos el grado de expresión de los transcritos del gen *nna1* de cada una de las muestras mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR).

Este método se basa en la detección de los productos de amplificación de la RT-PCR a través del fluorocromo SYBR Green I. Esta molécula se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del ADN y se acopla energéticamente a los nucleótidos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El complejo resultante ADN-SYBR Green presenta el pico de absorción en λ = 498 nm y el pico de emisión en λ = 522 nm (correspondiente a la zona verde del espectro, de ahí su nombre). Puesto que la unión es estequiométrica mayor cantidad de ADN (a mayor intensidad de emisión fluorescente). El termociclador está provisto de un sistema que le permite excitar el fluorocromo y recoger la señal emitida por éste al final de cada ciclo con lo que podemos medir la cantidad de ADN.

Como describimos anteriormente en la sección de Introducción, el gen *nna1* codifica 3 transcritos distintos de 1.218, 1.174 y 789 aminoácidos (http://bioinfow.dep.usal.es/xgate/principal.php?locus=ENSMUSG00000021557&especie=mus+musculus). Diseñamos dos cebadores distintos para la amplificación de los transcritos del gen *nna1*. El primero reconocía específicamente el transcrito de 1.218 aminoácidos (**nna1Tr1**). El segundo amplificaba una región común para los tres transcritos (el total: **nna1TrTot**). Además, como control de carga utilizamos cebadores que amplificaban el transcrito resultante de la transcripción del gen de la *gapdh* (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa).

Los cebadores para *nna1* se diseñaron de tal manera que cumplieran una serie de requisitos:

1) Longitud de unos 20 nucleótidos, aproximadamente.

2) 50% de G+C.

3) Temperatura de anillamiento de 60 ºC.

4) Longitud del amplicón de unas 100 pb, aproximadamente.

Tabla 5. Secuencias de los cebadores empleados para cada uno de los transcritos (S= Sentido; A= Antisentido).

nna1Tr1	Secuencia	nna1TrTot	Secuencia	GAPDH	Secuencia
S	5'-TGTCTGTGTGGA GGTGGGTA-3'	S	5'-CCCCATTGTAGT TCCCACAG-3'	S	5'-GCCTATGTGGC CTCCAAGGA-3'
A	5'-GGGCGGTCAGTT ATCTTCAG-3'	A	5'-CTTCCTTGGCTT CCTCTCCT-3'	A	5'-GTGTTGGGTGC CCCTAGTTG-3'

El medio en el que se llevaba a cabo la RT-PCR estaba compuesto por los cebadores (sentido y antisentido), el Mastermix® (contiene el SYBR Green; Promega), el ADNc de cada muestra y H_2O Mili-Q. Para la realización de la RT-PCR se empleó el termociclador 7.000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Las secuencias de nucleótidos de cada uno de los cebadores y las condiciones de tiempo y temperatura a las que se llevó a cabo la RT-PCR están detalladas en las tablas 5 y 6, respectivamente.

Tabla 6. Ciclos de tiempo y temperatura a las que se realizó la PCR

Paso	Tiempo	Temperatura
1	2 min	50 °C
2	10 min	95 °C
3	15 s	94 °C X40
4	1 min	60 °C
5	∞	4 °C

Para comprobar que los cebadores que habíamos diseñado eran específicos y sólo amplificaban la región deseada, realizamos una electroforesis en un gel de agarosa al 3% (p/v) de los resultados de la amplificación. El tamaño de banda coincidía en cada caso con las longitudes de los fragmentos teóricos amplificados (Fig. 10).

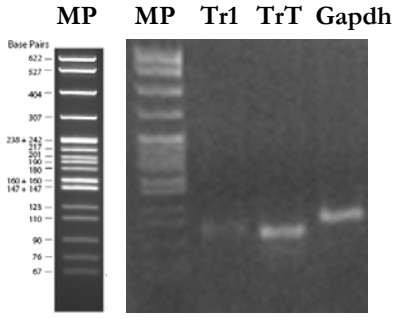

Figura 10. **Electroforesis del producto de la PCR.** El peso molecular de los productos amplificados para cada par de cebadores coincide con el peso teórico de la región diseñada para amplificar.

Otro parámetro que había que analizar para comprobar que sólo se había amplificado el producto esperado, era la **curva de temperatura de fusión** (Fig. 11). Existe una ratura en la que todos los productos se encuentran en la estructura secundaria de doble cadena. Cuando aumenta la temperatura, ocurre la desnaturalización y la fluorescencia emitida por el fluorocromo cae drásticamente. En condiciones óptimas, al representar la velocidad a la que varía la fluorescencia emitida frente al aumento de temperatura se obtiene un único pico que se corresponde con la temperatura de fusión de cada muestra amplificada.

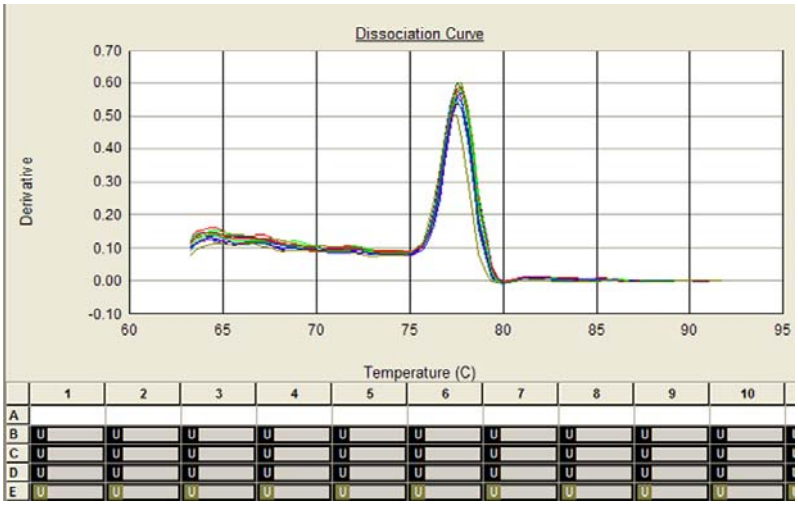

Figura 11. Curva de temperatura de fusión. La presencia de una única curva muestra que en todas las muestras sólo se ha amplificado un producto a una temperatura de 77 ºC.

Cuantificación de los datos

El sistema de cuantificación en la RT-PCR se basa en el número de ciclos necesarios para que una muestra alcance el **ciclo umbral**, que es el ciclo al que una determinada muestra alcanza un determinado valor de fluorescencia. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADNc de la muestra; es decir, a mayor cantidad de ADNc menor es el número de ciclos necesarios para alcanzar el ciclo umbral.

Para el estudio se emplearon tres muestras de cada grupo experimental y del gen control por triplicado.

La fase exponencial de la amplificación sigue la siguiente fórmula, donde **E**: eficiencia del proceso; $\mathbf{M_0}$: cantidad inicial de ADNc; $\mathbf{M_n}$: cantidad de ADNc en el ciclo "n"; **n**: número de ciclos.

$$M_n = M_0(E)^n$$

Se linealiza la ecuación para obtener una recta (Fig. 12) donde el eje X representa el $\mathbf{logM_0}$ y el eje Y representa el número de ciclos (**n**). Además, a partir de la pendiente de la recta se puede calcular la E; m = - (1/logE).

$$logM_n = logM_0 + n(logE)$$

Si $\mathbf{M_n}$ es la cantidad de producto correspondiente al nivel de fluorescencia fijado entonces **n** será el punto de cruce de cada muestra (**Cm**).

$$n = logM_n/logE - (1/logE)logM_0$$

$$Cm = logM_n/logE - (1/logE)logM_0$$

Se realizó una recta patrón estándar con cuatro diluciones seriadas del ADNc de los cerebelos (vermis) y bulbos olfatorios de los animales control (Fig. 12). Las cantidades de

ADNc empleadas eran de 50, 10, 1 y 0.1 ng. Como gen control utilizamos el *gapdh*. Sirviéndonos de esta recta se podía calcular la M_0 de cada muestra. Se representaba el número de ciclos frente al logaritmo de la cantidad inicial de ADNc ($\mathbf{M_0}$).

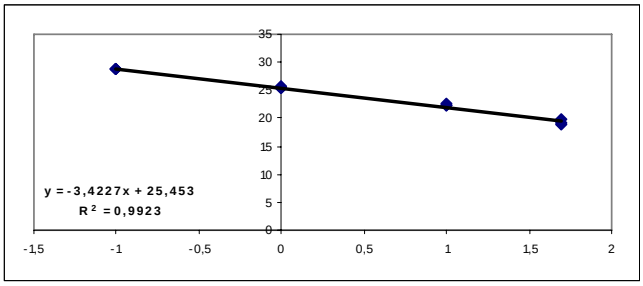

Figura 12. Recta patrón realizada con 4 diluciones diferente de una muestra de ADNc control. Los valores C de las muestras problemas pueden determinarse a partir de la recta.

A partir de aquí, suponiendo que la E es óptima, se aplica el método delta-C (ΔC; Livak y Schmittgen, 2001) para comparar la expresión de los genes problema con los genes control, donde **r** = gen de referencia y **g** = gen "problema":

$$\mathbf{\Delta C} = C_r - C_g$$

$$\mathbf{M_{0r}} = 2^{\Delta C}$$

Calculado este último valor, tanto para los genes de estudio (g) como para un gen de referencia (r), se divide el primero entre el segundo, corrigiendo así la variabilidad entre muestras de la cantidad inicial de ADNc:

$$\frac{(Eg)^{\Delta Cg}}{(Er)^{\Delta Cr}}$$

De este modo, para comparar las diferencias en el nivel de expresión génica se aplica el método delta-delta-C (ΔΔC) propuesta por Pfaffl (2001):

$$\mathbf{\Delta\Delta C} = \Delta C_r - \Delta C_g$$

$$\mathbf{M_{0r}} = 2^{-\Delta\Delta C}$$

Esta metodología nos permitió calcular los niveles de expresión de cada muestra y el poderlas comparar entre sí. Para estudiar si existían diferencias significativas entre los niveles de expresión de un transcrito a lo largo de la edad, o bien entre los dos transcritos a una misma edad se empleó el análisis estadístico de la *t* de Student. El nivel de significación se estableció en * $p<0.05$ ** $p<0.01$. Se utilizó el programa estadístico SPSS v14.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

Desarrollo del anticuerpo contra la proteína Nna1

Hasta el momento no se ha sintetizado ningún anticuerpo que reconozca la proteína codificada por el gen *nna1*. En el presente trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos desarrollar un anticuerpo policlonal contra la proteína Nna1. La síntesis del anticuerpo la llevó a cabo la empresa Genosphere Biotechnologies (París, Francia) a partir de un péptido previamente seleccionado por nosotros.

Elección de los péptidos

La elaboración de anticuerpos contra proteínas transmembrana no está exenta de complicaciones. Trabajos previos habían descrito la localización tanto citoplasmática como nuclear de la proteína Nna1 (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002). El primer análisis consistió en averiguar la probabilidad de que la proteína Nna1 fuera transmembrana. Para ello utilizamos el programa Transmembrane Helix Prediction (v 1.0).

Una vez comprobado que la proteína Nna1 no poseía secuencias específicas de hélices transmembrana, seleccionamos el péptido específico con el que se iba a inmunizar a conejos para obtener un suero policlonal. Dos factores claves en la elección del péptido fueron que: a) éste posea una alta antigenicidad (para que el anticuerpo se pueda unir bien a él), y b) una baja homología con el resto de secuencias aminoacídicas de las proteínas del ratón, para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo. Para el análisis de antigenicidad empleamos el programa Antigenicity plot, y el programa BLASTp para el estudio de homología entre secuencias aminoacídicas. La proteína Nna1 está formada por 1.218 aminoácidos. El péptido elegido constaba de 14 aminoácidos cuya secuencia era "GVETEDDEDTESHS". Esta secuencia peptídica era la que mayor antigenicidad tenía (Fig. 13) y la que presentaba una homología más baja con el resto de proteínas del ratón (Fig. 14).

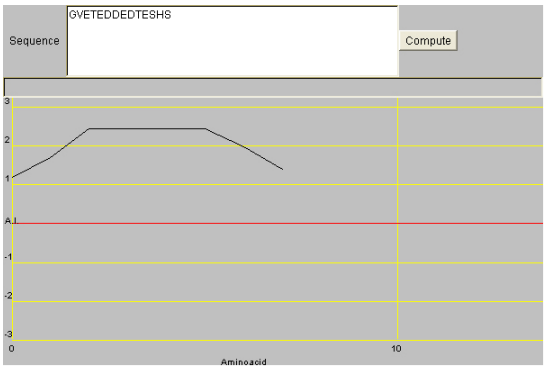

Figura. 13. Ensayo de antigenicidad. El péptido escogido mostraba un alto grado teórico de antigenicidad, cercano al máximo

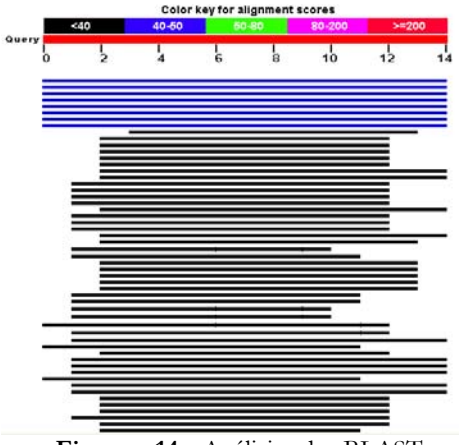

Figura. 14. Análisis de BLAST. Este análisis confirmó que la secuencia escogida presentaba una homología baja (azul) o muy baja (negra) con el resto de secuencias conocidas del ratón.

Síntesis del péptido e inmunización

Una vez elegido el péptido, éste se remitió a la casa comercial para la inmunización de los conejos. El protocolo que se siguió fue el siguiente. En primer lugar se sintetizaron 10 mg del péptido. La comprobación de la síntesis correcta del péptido se analizó mediante HPLC en fase inversa y espectrometría de masas. A continuación se realizaron 6 inmunizaciones secuenciales de 2 conejos a lo largo de un periodo de 3 meses. Por último, se extrajeron 50 ml de antisuero de cada uno de los conejos, que fueron titulados mediante ELISA. El anticuerpo fue testado tanto para inmunohistoquímica (en tejido y parafina), inmunocitoquímica para disociados neuronales y por *western-blot*.

Western-blot

Utilizamos la técnica de *western-blot* para la detección de proteínas nitrosiladas en el vermis, tanto de ratones control como de ratones mutantes PCD. El proceso completo se realizó como describimos a continuación.

Extracción y valoración de proteínas

Animales de 15, 20 y 25 días de edad posnatal, tanto ratones control como mutantes, se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se aisló rápidamente el vermis del cerebelo y se homogeneizó con el Poly-Tron (PT2100, Kinematica AG, Suiza) en 700 µl de tampón RIPA, que además contenía un cóctel de inhibidores de proteasas, ortovanadato de sodio y PMSF (del inglés: *PhenylMethaneSulphonylFluoride*; Santa Cruz). Se dejó reposar el homogenado durante 5 min a 4 ºC y se centrifugó posteriormente durante 10 min a 16.000 rpm. Se recogió el sobrenadante sobre un eppendorf frío y se agitó durante 1 min. Este proceso se repitió hasta un total de 3 veces. El extracto de proteínas se almacenó a -80 ºC hasta su uso.

La valoración de la cantidad de proteínas totales obtenidas se llevó a cabo mediante el método Bradford (1976). Para ello elaboramos una recta patrón utilizando una solución madre con una concentración de 1 mg/ml de BSA (A-7030, Sigma-Aldrich, Madrid). A partir de esta solución madre se obtuvieron diluciones que contenían 2.5, 12.5, 25 y 50 µg/ml de BSA. Se tomaron 400 µl de cada una de las diluciones y se les añadió 400 µl de SDS al 0.004% (p/v) y 200 µl del reactivo de Bradford (BioRad). Se dejó incubar durante 10 min a TA, y se midió su absorbancia para una longitud de onda de 595 nm en un espectrofotómetro. Con estos datos se elaboró una recta patrón, con la concentración de proteínas en un eje, y la absorbancia a 595 nm en el otro eje.

El extracto de proteínas se diluyó a una concentración de 1:1.000 en H_2O para que el SDS que quedase no interfiriera en la valoración proteica. De estas diluciones, se tomaron 800 µl a los que se les añadieron 200 µl del reactivo de Bradford (BioRad). Se mezclaron y dejaron reposar durante 10 min a TA. A continuación se midió su absorbancia a 595 nm. Los resultados de absorbancia se aplicaron a la recta patrón para así calcular la cantidad de proteína de cada muestra.

Preparación de los geles de SDS-poliacrilamida

El siguiente paso fue separar las proteínas mediante electroforesis. Los geles utilizados para la separación fueron de poliacrilamida (composición indicada en la parte inferior), de un grosor de 1.5 mm. El porcentaje de poliacrilamida de los geles utilizados para la separación de las proteínas analizadas fue del 10% (p/v).

Gel de concentración	**Gel de separación**
H_2O destilada (6.05 ml)	H_2O destilada (15.9 ml)
Acrilamida/Bisacrilamida (37.5:1; 1.25 ml)	Acrilamida/Bisacrilamida (6 ml)
Tampón Tris (0.5 M, pH 6.8; 2.5 ml)	Tampón Tris (1.5 M, pH 8.8; 7.5 ml)
SDS 10% (v/v; 300 µl)	SDS 10% (v/v; 100 µl)
APS (Biorad; ver abreviaturas; 300 µl)	APS (100 µl)
TEMED (Biorad; ver abreviaturas; 12 µl)	TEMED (10 µl)

El gel de separación se depositó entre los cristales de electroforesis hasta dos tercios de su altura. El resto se recubrió con H_2O ultrapura y se esperó hasta la polimerización del gel. Posteriormente, se eliminó el H_2O y se añadió el gel de concentración, insertando rápidamente el peine para la formación de los pocillos. Una vez polimerizado el gel de concentración se retiró el peine para comenzar la electroforesis.

Electroforesis

Se resuspendieron 80 µg de cada una de las muestras de proteínas en 5 µl de tampón de carga (Bio-Rad) y EGTA 5 mM (del inglés: *EthyleneGlycolTetraaceticAcid*; Sigma) con el fin de que el calcio no afectase a la movilidad electroforética de las proteínas. A continuación, para desnaturalizar las proteínas, se hirvieron las muestras durante 5 min a 100 ºC, y tras centrifugarlas a 12.000 rpm se mantuvieron en hielo. Finalmente, las muestras se cargaron en el gel de agarosa, el primero de los pocillos para el marcador de peso molecular (Bio-Rad). Para la separación de las proteínas se aplicó una diferencia de potencial de 160 V durante aproximadamente 1 hora y media. El tampón en el que se realizó la separación contenía 10% (p/v) de Tris-glicina pH 8.3 y 10% SDS (p/v) en H_2O.

Una vez concluida la separación, procedimos a la transferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF (del inglés: *PolyVinildeneDiFluoride*). Para ello, se aplicó un voltaje de 90 V durante 2 horas y media a 4 ºC, de tal forma que las proteínas previamente separadas en el gel se transfirieron a la membrana. El tampón utilizado para la transferencia estaba compuesto de 0.1 M Glicina, 0.025 M Tris base, 20% (v/v) metanol y H_2O.

Por último, para detectar si la transferencia de las proteínas a la membrana había sido efectiva, utilizamos la tinción con rojo Ponceau al 0.1% (p/v) diluido en ácido acético al 5%. Esta coloración marca las proteínas transferidas a la membrana, mientras que las proteínas que no lo hayan hecho se detectan introduciendo el gel en azul de Comassie al 0.13% (p/v).

Inmunodetección

Para realizar el inmuno-blot sobre la membrana llevamos a cabo el siguiente protocolo. La membrana se preincubó con un medio de bloqueo formado por leche desnatada en polvo al 5% (p/v) en TFS-Tween al 0.5% (v/v) a TA durante 1 hora. A continuación, se incubó el anticuerpo primario contra la 3-nitrotirosina (1:2.000; anticuerpo policlonal hecho en rata; Advanced Targeting Systems, San Diego, EE.UU.) durante la noche a 4 ºC. Al día siguiente se lavó la membrana con TFS-Tween 0.5% (3 x 10 min) y se incubó el anticuerpo secundario biotinado anti-rata (1:500; Jackson) a TA durante 1 hora. Posteriormente se lavó de nuevo la membrana (3 x 10 min) y se incubó durante 1 hora el complejo de estreptavidina (que se une a la biotina) conjugado con peroxidasa (1:500; Vector). Por último, utilizamos un kit de quimioluminiscencia para detectar el anticuerpo (Western-blotting luminol reagent, Santa Cruz). Este kit posee H_2O_2 que se reduce en presencia de la peroxidasa. El luminol presente en la reacción se oxida, dando lugar a un compuesto que emite luz. Para la documentación, la membrana se expone a una película de autorradiografía que detecta la señal quimioluminiscente. Finalmente, las películas se revelaron según un protocolo mecanizado (Kodak X-OMAT 2000, EE.UU.).

Técnicas de análisis histológico

Obtención y seccionamiento del tejido

Para el estudio con la técnica inmunohistoquímica se emplearon secciones de tejido de animales de 15, 20, 25, y 30 días de edad posnatal. Los animales se anestesiaron con una mezcla 3:4 de ketamina (Imalgène, Merial, Francia) e hidrato de xilacina (Rompún, Bayer, Alemania). A continuación, por vía intraórtica se administró 0.1 ml de heparina, y se perfundieron los animales con NaCl 0.9% (p/v), seguido de una solución fijadora compuesta por tampón fosfato (TF) 0.2 M pH 7.4, ácido pícrico al 2% (v/v) y 4% de paraformaldehído (PFA; p/v) durante 15 min. Se aislaron los vermis de los cerebelos y se posfijaron en la misma solución fijadora durante 2 horas. Posteriormente, las secciones se lavaron con TF 0.1 M pH 7.4 (5 x 10 min). Para su crioprotección, los bloques de tejidos se sumergieron en sacarosa al 30% (p/v) durante una noche a 4 ºC, hasta que se hundieron. Finalmente, los bloques de tejido se congelaron con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 ºC hasta su uso. Las secciones de tejido se obtuvieron con un microtomo de deslizamiento (Jung SM 2000, cuchilla tipo C, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Alemania) acoplado a una unidad de congelación (Frigomobil, Leica). Se realizaron secciones sagitales del vermis de 30 µm de grosor, que se recogieron en TF 0.1 M en placas multipocillo en 6 series. Por último, se almacenaron las secciones a -20 ºC en mezcla congeladora compuesta por 30% de glicerol (v/v) y 30% (v/v) de polietilenglicol en TF 0.1 M.

Técnica inmunohistoquímica en tejido

La detección de los distintos antígenos (Tabla 7) mediante inmunofluorescencia en secciones de tejido se realizó mediante el siguiente procedimiento. Una vez obtenidas las secciones siguiendo la metodología previamente detallada, éstas se lavaron en tampón fosfato salino (TFS; 3 x 10 min). Con el fin de eliminar la autofluorescencia debida a los aldehídos, las secciones se incubaron con borohidruro sódico 1% (p/v) durante 20 min (Weruaga-Prieto et al., 1996). Después se lavaron en TFS (5 x 10 min) y se pre-incubaron durante 1 hora en una mezcla que contenía 0.1% (v/v) de Triton X-100, 5% del suero correspondiente (v/v; Sigma) diluido en TFS. Específicamente para la detección del factor de transcripción Olig2 se añadía también a este medio DMSO al 1% (v/v). A continuación, en la misma mezcla se incubaron los antisueros primarios durante 24 horas a temperatura ambiente (TA). Tras la incubación se lavaron las secciones en TFS (3 x 10 min) y se incubaron, durante 2 horas, a TA en oscuridad con el antisuero secundario correspondiente (1:500) en TFS. En la tabla 7 se enumeran los anticuerpos secundarios empleados para detectar cada primario. Por último, tras lavar las secciones con TFS (3 x 10 min) se montaron en portaobjetos gelatinizados con un medio "anti-desvanecimiento" (ver Apéndice).

Tabla 7. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados con la técnica inmunohistoquímica

Anticuerpo primario	Referencia	Dilución	Anticuerpo secundario
Anti-Calbindina (conejo)	Swant, Suiza	1:7.000	Cy3 anti-IgG de conejo
Anti- Calbindina (ratón)	Swant, Suiza	1:2.000	Cy2 anti-IgG de ratón
Anti-GFAP (ratón)	Sigma, EE.UU.	1:2.000	Cy2 anti-IgG de ratón
Anti-Iba1 (conejo)	Wako Chemicals, EE.UU.	1:1.000	Cy3 anti-IgG de conejo
Anti-MBP (pollo)	Chemicon, EE.UU.	1:100	Cy2 anti-IgG de pollo
Anti–Olig2 (conejo)	Chemicon, EE.UU.	1:100	Cy3 anti-IgG de conejo
Anti–Tuj1 (conejo)	Covance, EE.UU.	1:1.000	Cy3 anti IgG de conejo

Controles de las técnicas de inmunohistoquímica

Para comprobar que no existían uniones inespecíficas, y por lo tanto que no detectábamos falsos positivos, llevamos a cabo los siguientes controles:

- Omisión de los anticuerpos primarios para detectar uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios a proteínas del tejido.
- Omisión de los anticuerpos secundarios para detectar emisión de fluorescencia inespecífica.
- En el caso de doble inmunofluorescencia, incubación con uno de los dos anticuerpos primarios y adición del anticuerpo secundario correspondiente al anticuerpo primario omitido para detectar uniones cruzadas.

En ninguno de los casos detectamos falsos positivos por uniones inespecíficas.

Inclusión en parafina

Para el análisis de la expresión de los distintos grados de tirosinación de la α-tubulina utilizamos secciones de tejido incluido en parafina. La fijación del tejido se realizó siguiendo el mismo protocolo que hemos descrito previamente. Tras aislar el vermis, se deshidrató en concentraciones crecientes de alcohol:

Alcohol	**Tiempo**
Alcohol 50%	15 min
Alcohol 70%	30 min
Alcohol 80%	30 min
Alcohol 90%	30 min
Alcohol 96%	2 x 1 hora
Alcohol 100%	3 x 30 min
Tolueno	2 x 15 min

Una vez deshidratado, el tejido se incluyó en parafina (Paraplast Plus, Panreac, España) durante toda la noche a 60 ºC. Al día siguiente se realizaron dos cambios de parafina (2 x 2 h). Por último, con un microtomo (Leica 2065, Alemania) se realizaron secciones de 5 μm de grosor que se recogieron en portaobjetos tratados con polilisina (Thermo scientific, Alemania).

Técnica inmunohistoquímica en parafina

Sobre las secciones de parafina se analizó, mediante inmunohistoquímica, el patrón de expresión de la Tyr-Tub, Glu-Tub y la Δ-Tub. El primer paso fue la desparafinación e hidratación de las secciones. Para ello pasamos las muestras por xilol y por concentraciones decrecientes de alcohol (xilol, etanol 100%, 96%, 90%, 80%, 70%, 50%) y agua.

A continuación, con el fin de inactivar las peroxidasas endógenas, las secciones se trataron con H_2O_2 al 3% (v/v) a 27 ºC durante 15 min. Posteriormente, las muestras se incubaron con una solución que contenía TFS, seroalbúmina bovina (BSA) al 0.3% (p/v) y Triton X-100 al 0.5% (v/v) durante 6 min. Seguidamente, las secciones se preincubaron con una solución compuesta por TFS y BSA al 3% (p/v) durante 30 min. Por último, se incubaron los anticuerpos primarios (Tabla 8) durante toda la noche a 4 ºC. Al día siguiente, las muestras se lavaron (3 x 5 min) con TFS-Tween 0.1% (v/v), para después incubar el anticuerpo secundario biotinado correspondiente (anti-conejo o anti-rata; 1:500) durante 30 min, a TA. Transcurrido ese tiempo, las secciones se lavaron con TFS-Tween 0.1% (v/v) y se incubaron con el complejo Avidina-Biotina-Peroxidasa durante 30 min a TA. Para el revelado se utilizó una mezcla de 3,3'-diaminobenzidina (DAB) al 0.03% (v/v) y H_2O_2 al 0.0033% (v/v) en TFS-Tween 0.1%. La peroxidasa reduce el H_2O_2 y hace que se oxide la DAB originando precipitados de color marrón. Finalmente, las secciones se deshidrataron en una batería de alcoholes de gradación creciente y xilol (5 min en cada paso), y se montaron con Entellan (Merck).

Tabla 8. Anticuerpos primarios empleados para la detección de las distintas formas de la α-tubulina

Anticuerpo	Referencia	Dilución
Anti-Tyr-Tub	Abcam (ab6160)	1:1.000
Anti-Glu-Tub	Millipore (AB2301)	1:500
Anti-Δ-Tub	Millipore (AB3203)	1:500

Disociado de neuronas

El estudio de los compartimentos nucleares de las CP se realizó con preparaciones de disociados neuronales (Fig. 15; Lafarga et al., 1998; Pena et al., 2001). Para la obtención de los disociados neuronales se perfundieron los ratones con PFA (1 ml/g de peso) al 3.7% (p/v) en TFS 0.1 M, pH 7.4. Seguidamente se aisló el vermis del cerebelo y se dejó en posfijación en la misma solución durante 25 min en agitación a TA. A continuación, se obtuvieron secciones sagitales de 250 µm de grosor con un vibratomo (Leica). El disociado neuronal se obtuvo depositando una pequeña porción de vermis que contenía CP sobre un portaobjetos (SuperFrostPlus®, Menzel-Gläser, Alemania). La muestra se cubrió con 10 µl de TFS y sobre ella se situó un cubreobjetos de 18x18 mm. A continuación se fueron disociando las neuronas mediante percusión mecánica con una aguja histológica. El grado de disociación y la preservación citológica de las neuronas se controló bajo el microscopio. Con el fin de poder retirar el cubreobjetos sin dañar el disociado neuronal adherido al portaobjetos, las muestras se congelaron con nieve carbónica durante 5 min. Una vez retirado el portaobjetos, los disociados neuronales se sumergieron en etanol de 96% (v/v) a 4 ºC y después se pasaron a TFS para su almacenamiento a 4 ºC, hasta su uso.

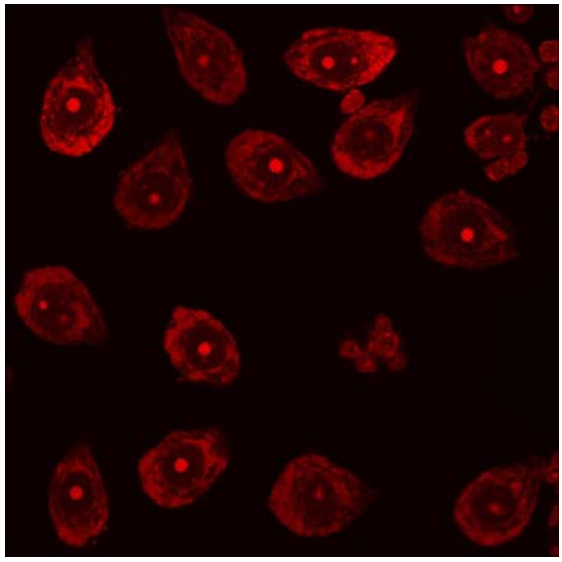

Figura 15. Ejemplo de disociado de CP a partir del vermis del cerebelo contrateñidas con ioduro de propidio (IP). Además, se pueden observar otros elementos neurales del cerebelo.

Inmunofluorescencia en disociados neuronales

Para la inmunofluorescencia convencional, las muestras de CP disociadas y fijadas con PFA al 3.7% en TFS se trataron secuencialmente con glicina 0.1 M en TFS durante 15 min y después se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% (v/v) durante 45 min. Posteriormente, los disociados se lavaron con TFS-Tween-20 al 0.05% (v/v). Cuando se realizó inmunofluorescencia simple, las muestras se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4 ºC (Tabla 9). Tras la incubación, los disociados neuronales se lavaron con Tween-20 0.05% (v/v) en TFS y se incubaron en oscuridad durante 45 min con el anticuerpo secundario correspondiente (Tabla 9; Jackson, EE.UU.). En algunas ocasiones, el disociado neuronal se contrateñía con IP (1:2.000) durante 15 min. Finalmente se lavaron en TFS y se montaron con una solución "anti-desvanecimiento".

En el caso de realizar una inmunofluorescencia doble, se incubó uno de los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 ºC. Al día siguiente, se lavaron los disociados neuronales con TFS-Tween-20 0.05% y se incubó el segundo de los anticuerpos primarios durante 1 hora a TA. A continuación, se lavó con TFS-Tween 20 (3 x 5 min) al 0.05% y se revelaron siempre, en primer lugar, los anticuerpos primarios monoclonales con FITC (1:150) durante 45 min, para posteriormente revelar los anticuerpos policlonales con el fluorocromo Texas-Red (Jackson, EE.UU.), también durante 45 min. Finalmente, los disociados neuronales se lavaron con TFS y se montaron con una solución anti-desvanecimiento. Los anticuerpos primarios usados y sus diluciones se enumeran en la tabla 9. Las muestras se analizaron con un microscopio láser confocal (Zeiss LSM 510) usando un objetivo plan-apocromático de 63X (1.4 AN), y láseres de Ar (488 nm) y HeNe (543 nm).

Tabla 9. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los disociados neuronales

Anticuerpo primario	Referencias	Dilución	Anticuerpo secundario
Anti-53BP1 (conejo)	Novus Biologicals, EE.UU.	1:200	Texas-Red anti-IgG conejo
Anti-ATM pS1981 (conejo)	Rockland, EE.UU.	1:100	Texas-Red anti-IgG conejo
Anti-Coilina (conejo)	(Bohmann et al., 1995)	1:75	Texas-Red anti-IgG conejo
Anti-Fibrilarina (ratón)	(Reimer et al., 1987)	1:10	FITC anti-IgG ratón
Anti–γH2AX (ratón)	Upstate, EE.UU.	1:300	FITC anti-IgG ratón
Anti– H4-3Me-K20 (conejo)	Upstate, EE.UU.	1:100	Texas-Red anti-IgG conejo
Anti-Proteasoma 20S (conejo)	(Mengual et al., 1996)	1:1.000	Texas-Red anti-IgG conejo

Análsisis estadístico

El recuento de número de CC por CP se realizó sobre disociados neuronales. Se emplearon disociados neuronales de 3 animales de cada grupo experimental, control y PCD de P15 y P20. Se contabilizó el número de CC por cada CP en un total de 200 CP por animal. Para estudiar si existían diferencias significativas entre los animales control y los PCD se empleó el análisis estadístico de la *t* de Student. El nivel de significación se estableció en ** $p<0.01$. Se utilizó el programa estadístico SPSS v14.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.).

TUNEL (Terminal transferase-mediated dUTP Nick End Labelling)

En tejido

La técnica de TUNEL en tejido se empleo para la detección de apoptosis. La fijación y corte del tejido se realizó como hemos descrito anteriormente. Las secciones se lavaron con TFS 0.1 M pH 7.4 (3 x 10 min). A continuación, se fijó de nuevo el tejido con una mezcla de etanol : ácido acético (2:1) a -20 ºC durante 5 min, para después lavar con TFS (3 x 10 min). Posteriormente, para reducir el marcaje de fondo, se incubaron las secciones con borohidruro sódico (5 mg/ml) durante 20 min a TA. Posteriormente, se permeabilizó el tejido durante 15 min con una solución compuesta de 0.2% (v/v) Triton X-100 y 0.1% (v/v) de citrato sódico preparada en el momento. El siguiente paso fue la incubación de las secciones en tampón TUNEL (30 mM Tris pH 7.2, 140 mM de cacodilato de sodio, 1 mM de cloruro de cobalto, 0.3% de Triton X-100). A continuación, se incubó la preparación con **Transferasa terminal** (2 µl/ml; Roche) y **dUTP-biotinado** (1 µl/ml; Roche) durante 2 horas a 37 ºC, en tampón TUNEL. La reacción se paró con tampón SSC (2 x 10 min) y con TFS (3 x 10 min). Después se incubaron las secciones con el fluorocromo Cy2 conjugado con estreptavidina (1:500) para tener una señal visible tras su unión con la biotina.

La técnica de TUNEL se utilizó en combinación con la técnica inmunohistoquímica. Se realizaron 2 pruebas para elegir el orden de los procedimientos y los mejores resultados se obtuvieron aplicando en primer lugar la inmunohistoquímica y después la técnica de TUNEL.

En disociados neuronales

El protocolo de fijación y permeabilización del disociado que empleamos fue el mismo que el utilizado para realizar la inmunofluorescencia convencional. Una vez permeabilizado el disociado, se lavó con TFS y se incubó con la mezcla de TUNEL que contenía 47.5 µl de tampón TUNEL y 2.5 µl del enzima transferasa terminal que tenía acoplado el fluorocromo Cy3 (Roche) durante 45 min a 37 ºC. A continuación, se lavaron las muestras con TFS y se montaron las secciones con una solución anti-desvanecimiento. Cuando se acopló la técnica TUNEL con la técnica de inmunofluorescencia, en primer lugar se llevaba a cabo el protocolo para la inmunofluorescencia (arriba descrito) y a continuación el protocolo para la detección del TUNEL, de manera idéntica a lo empleado con secciones de tejido. Las muestras se examinaron con un microscopio láser confocal (Zeiss LSM 510) usando un objetivo plan-apocromático de 63X (1,4 AN), y láseres de Ar (488 nm) y HeNe (543 nm).

Microscopía electrónica

Inclusión en Araldita

Examinamos la ultraestructura de las CP a lo largo de su etapa degenerativa, para ello empleamos ratones control y mutantes PCD de 15, 20 y 25 días de edad posnatal. Los ani-

males de experimentación se perfundieron con una solución fijadora que contenía glutaraldehído al 3% (v/v), PFA al 1% (p/v) y cloruro cálcico al 0.5% en TF 0.12 M (pH 7.4). A continuación, se aisló el vermis y se mantuvo en posfijación en la misma solución fijadora durante toda la noche a 4 ºC.

Con un vibratomo se obtuvieron secciones sagitales del vermis, de 500 µm de grosor, que se lavaron en TF 0.1 M, se posfijaron con tetraóxido de osmio al 2% (v/v) diluido en tampón de doble-fuerza 0.12 M (ver Apéndice). Posteriormente se lavaron las secciones (3 x 15 min) con solución Palay 0.12 M (ver Apéndice), seguido de lavados (6 x 15 min) con cloruro de sodio al 2.4% (p/v). Después, los bloques de tejido se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol. Una vez deshidratados, los bloques de tejido se incluyeron en Araldita (Durcupan ACM, Fluka, Suiza) siguiendo el protocolo indicado en la tabla 10:

Tabla 10. Protocolo de inclusión en araldita

Solución	Tiempo	Temperatura
Oxido de propileno : Mezcla B (3:1)	1 h	TA
Oxido de propileno : Mezcla B (2:2)	3 h	TA
Mezcla B	3 h	TA
Mezcla B	Toda la noche	TA

Composición de la Mezcla B (ver Apéndice)

La polimerización de la resina se realizó en una estufa a 65 ºC durante 2 días. Finalmente, los bloques se cortaron con un ultramicrotomo. Se practicaron cortes semifinos de 1 µm de grosor con un ultramicrotomo (Leica Ultracut UCT) y se tiñeron con una solución de azul de toluidina (ver Apéndice), que sirvieron para seleccionar la zona de la CCP para el estudio ultraestructural. Brevemente, los cortes semifinos se cubrieron con la solución de azul de toluidina y se calentaron en una placa calefactora hasta que la solución comenzó a evaporarse. Luego se retiró el exceso de solución y se secaron las secciones durante una noche en una estufa a 37 ºC. Por último, se aclararon las secciones con xileno para poder cubrirlas con el medio de montaje para microscopía Entellan® y un cubreobjetos. Las secciones ultrafinas de 50 nm de espesor se recogieron en rejillas niqueladas recubiertas de una película de Formvar® (Sigma) para su observación con un microscopio electrónico (Philips EM-208) que opera a 60 kV.

Inclusión en Lowicryl

Para poder detectar proteínas específicas con el microscopio electrónico la inclusión del tejido se llevó a cabo en Lowicryl. Para ello se perfundieron los ratones con PFA 4% en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 durante 20 min. A continuación, se realizaron cortes de 300 µm de espesor en el vibratomo y se dejaron en agitación en el mismo fijador durante 100 min a TA. Los cortes se lavaron posteriormente en tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 (3 x 15 min). Seguidamente, las secciones se lavaron (2 x 25 min) en una solución de tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 que contenía 50 mM de cloruro de amonio a 4 ºC. De nuevo, los

bloques de tejido se lavaron con tampón cacodilato 0.1 M pH 7.4 (3 x 10 min) a 4 ºC. Posteriormente, los bloques de tejido se deshidrataron en concentraciones crecientes de metanol a las temperaturas que se indican en la tabla 11.

Tabla 11. Protocolo de deshidratación

Solución	Tiempo	Temperatura
Metanol (30%)	10 min	4 ºC
Metanol (50%)	10 min	4 ºC
Metanol (70%)	10 min	-10 ºC
Metanol (90%)	2 x 20 min	-20 ºC
Metanol (90%): Lowicryl (1:1)	45 min	-20 ºC
Metanol (90%): Lowicryl (1:2)	45 min	-20 ºC
Lowicryl	1 h	-20 ºC
Lowicryl	Toda la noche	-20 ºC

Posteriormente, los bloques de tejido se encapsularon en gelatina transparente, evitando el contacto con el aire. Los bloques de gelatina se colocaron en una caja forrada en papel de aluminio y la resina se polimerizó bajo lámpara de ultravioleta (366 nm; Philips T16/05) situada a unos 30 cm de las cápsulas. La polimerización se realizó durante 5 días a -20 ºC, y posteriormente durante 3 días a TA.

Técnica inmunocitoquímica

Para la detección de la coilina en los cuerpos de Cajal durante la degeneración de las CP se utilizó la técnica inmunocitoquímica. Se realizaron secciones ultrafinas del vermis de 70 nm de grosor y se recogieron sobre rejillas de níquel filmadas recubiertas de una película de Formvar. A continuación, se colocaron las rejillas sobre gotas de 0.1% (p/v) de tampón BSA-Tris, pH 7.4 (ver Apéndice) durante 30 min a TA. Posteriormente, las rejillas se pusieron en cámara húmeda, sobre gotas de una solución que contenía 0.1% (p/v) de BSA-Tris, 1% de suero fetal bovino inactivado por calor y el anticuerpo policlonal anti-coilina (1:50) durante 1 hora a 37 ºC. Las rejillas se lavaron con tampón BSA-Tris a TA (3 x 10 min) y se colocaron sobre gotas que contenían 0.1% BSA-Tris y el anticuerpo secundario anti-conejo (1:100) que estaba marcado con oro coloidal durante 45 min. A continuación, se lavaron las rejillas con 0.1% BSA-Tris (3 x 10 min) y luego con H_2O destilada (1 x 10 min). Finalmente, las rejillas se dejaron secar al aire y se contrastaron con acetato de uranilo. Los resultados se observaron con un microscopio electrónico (Philips EM-208) que opera a 60 kV.

Hibridación in situ de ADN telomérico

Durante el presente trabajo de Tesis Doctoral abordamos el estudio del estado de la cromatina del núcleo de las CP tanto de los animales control como de los ratones PCD. Un tipo específico de cromatina que estudiamos fue el posicionamiento del ADN telomérico.

Para ello utilizamos la técnica de hibridación *in situ* que aplicamos a los disociados neuronales de CP. Una vez obtenidos los disociados, se lavaron con TFS (3 x 5 min) y a continuación se permeabilizaron con Triton X-100 al 0.5% (p/v) durante 45 min. A continuación, se preparó la sonda de la hibridación que contenía:

1) Tris 10 mM pH 7.2
2) Formamida deionizada al 70% (v/v).
3) Sonda específica para unión a ADN telomérico marcada con el fluorocromo Cy3 (0.5 µg/ml. DNAtelom, DakoCytomation, Dinamarca)
4) 0.25% suero de bloqueo
5) Tampón $MgCl_2$ pH 7.0
   - $MgCl_2$ 25 mM
   - Ácido cítrico 9 mM
   - Na_2HPO_4 82 mM
6) H_2O destilada

Se desnaturalizaron las muestras a 80 ºC durante 3 min y se incubó la sonda durante 2 horas a TA en una cámara húmeda, se lavaron las muestras (2 x 10 min) en agitación, con una solución que contenía (Tris 10 mM pH 7.2, Formamida al 70% (v/v), BSA al 0.1% (p/v) y H_2O destilada)

Seguidamente, las muestras se lavaron (3 x 5 min) con TBS (Tris 100 mM pH 7.0, NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.08%) y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (70%-90%-100%). Se dejaron secar las muestras y se cubrieron con solución antidesvanecimiento.

Hibridación in situ de la cadena de Poli(A)

La técnica de la hibridación *in situ* para la cadena de Poli(A) se realizó sobre los disociados neuronales para detectar la distribución del ARN poliadenilado. En primer lugar se lavaron las muestras con TFS (3 x 5 min) a TA, para después permeabilizar con TBS-E-SDS en dos pasos, un primer paso de permeabilización a 37 ºC (10 min) y después durante 5 min a TA. A continuación, las muestras se lavaron con la solución 6X SSPE-Tween 0.1% (3 x 5 min) a TA. Posteriormente se incubaron 10 µl de una mezcla que contenía ARNt, solución Denhart 50X y SSPE 6X, durante 45 min a TA. La hibridación se realizó incubando una sonda biotinada (2'-O-alquil oligoribonucleótido Poli(U) que contenía 20 residuos de uridina en tándem; Biomers, Ulm, Alemania) durante 3 horas a TA y a continuación se lavaron las muestras con tampón 6X SSPE (3 x 5 min). A partir de este momento, todos los pasos del protocolo se realizaron a 37 ºC. Se retiraron los restos de la sonda con tampón 4X SSC-Tween 0.1% (2 x 5 min). El revelado se realizó con el fluorocromo FITC que estaba unido a avidina (que le permite unirse a la biotina de la sonda). La mezcla que contenía el complejo FITC-avidina estaba formada por tampón 4X SSC-Tween 0.1% y BSA al 10% y la incubación duró 30 min. Para amplificar la señal se incubó con un comple-

jo avidina-biotina (30 min) y se volvió a reincubar con el complejo FITC-Avidina (30 min). Finalmente, se lavaron las muestras con 4X SSC-Tw 0.1% y se cubrieron con solución VectaShield (Vector).

Técnica de análisis de comportamiento

Prueba de la barra giratoria (Rota-rod)

Con el fin de analizar la capacidad motora de los animales de experimentación, utilizamos el *test* de equilibro de Rota-rod. Se sometió al ensayo a diez ratones mutantes PCD y diez ratones control, todos ellos de 15 días de edad posnatal (P15). El *test* se realizó siempre en las mismas condiciones, entre las 9:00 y las 14:00 horas, y en silencio para evitar falsas medidas debidas al reflejo de sobresalto.

Todos los ratones se colocaron en una barra moleteada con una velocidad de rotación de 4 rpm (Rota-rod LE 8200, Letica Scientific Instruments, Barcelona). Cuando todos ellos caminaban sobre la barra en la misma dirección durante al menos 10 s, se accionó una aceleración de 0.6 rpm/s. En cada caso, se apuntó la velocidad máxima y el tiempo al que cayeron de la barra por pérdida de equilibrio. La prueba se repitió 7 veces con intervalos de descanso de 20 min. Para el análisis estadístico se eliminaron los resultados de la primera y la última medición. Para realizar el análisis estadístico se empleó el *test* de la *t* de Student para la comparación de dos grupos. El nivel de significación se estableció en * $p<0.05$ y ** $p<0.01$. Se utilizó el programa estadístico SPSS v14.0 (SPSS, Chicago, IL, EE.UU.)

.

RESULTADOS

Degeneración de las células de Purkinje

Estudios previos han descrito que la degeneración de las células de Purkinje ocurre entre P20 y P30 (Landis y Mullen, 1978; Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007). Por lo tanto, nosotros hemos analizado el proceso neurodegenerativo de las CP en el vermis del cerebelo de ratones control y mutantes, desde P15 hasta P30 para abarcar los periodos pre- y neurodegenerativo de las CP (Fig. 16; **ver sección "Iconografía"**). Nuestros resultados coinciden con los previamente descritos (Fig. 16 A-D). Sólo unas pocas CP sobrevivían en los ratones PCD P30. Curiosamente, estas CP siempre se encontraban localizadas en la zona nodular (Fig. 16 D) y normalmente sobreviven al menos hasta la edad de P50 (datos no mostrados).

El estudio ultraestructural permitió detectar que las CP del ratón PCD podían seguir dos vías de muerte bien diferenciadas, la necrosis (Fig. 17 A-C) y la apoptosis (Fig. 17 D-F). Las células que morían por necrosis mostraban unos cambios morfológicos muy bien definidos, entre los que se encontraban la disgregación de la membrana celular, la hinchazón citoplasmática y la desaparición de orgánulos celulares (Fig. 17 B-C). En cambio, las CP que morían por apoptosis se caracterizaban bien por un proceso de compactación de la cromatina (marginándose ésta en un principio hacia la membrana nuclear) bien por la formación de grandes masas de cuerpos apoptóticos. También detectamos vacuolización citoplasmática, aunque los orgánulos permanecen y la membrana celular no se rompe (Fig. 17 D-F).

Pre-neurodegeneración de las células de Purkinje

Análisis de la capacidad motora del ratón PCD

Los resultados obtenidos por distintos grupos mostraban que no existían diferencias significativas en la densidad de CP entre el ratón control y el ratón mutante PCD hasta P20 (Landis y Mullen, 1978; Fernández-González et al., 2002). Sin embargo, a P15 ya observábamos cierto fenotipo atáxico en el ratón PCD. Quisimos analizar si realmente a edades previas a la muerte de las CP se pudieran manifestar alteraciones en la correcta función del cerebelo. Para ello empleamos el test del Rota-rod, que permite analizar la habilidad motora tanto de los animales control como de los PCD de P15. Nuestros resultados (Fig. 18) mostraban que a P15 existían diferencias altamente significativas entre los animales control (100.91 ± 9.46; $n = 10$; media ± desviación estándar) y los animales mutantes (61.24 ± 4.52; $n=10$). Por lo tanto, la habilidad motora de los ratones PCD era mucho menor que la de los controles, reflejando una alteración a nivel cerebeloso ya desde P15.

Citología de las células de Purkinje del ratón PCD

Puesto que los animales PCD P15 ya mostraban fenotipo atáxico, decidimos analizar la citología de las CP en este estadio, que consideramos pre-neurodegenerativo. Analizamos la morfología de las CP del ratón PCD con el microscopio electrónico. En el citoplasma, una de las alteraciones más tempranas que detectamos en algunas CP del ratón PCD (ya desde P15) es la desestructuración del RER. Las cisternas de RER comienzan a desaparecer (Fig. 19 A-D), reflejándose en un aumento de ribosomas libres que se localizaban principalmente en el polo basal de la CP. Además, nuestro estudio por hibridación de *microarrays* ha permitido detectar un incremento en la tasa de transcripción de genes que comprometen la estabilidad del RER, por ejemplo, el *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2* (PERK), el *endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1* (IRE1) o el *p38 MAPK*, entre otros.

Como acabamos de indicar, a P15 no existían diferencias en la densidad de CP entre los ratones control y los mutantes (Landis y Mullen et al., 1978; Fernández-González et al., 2002), sin embargo, hemos detectado signos patológicos pre-neurodegenerativos en la morfología de la CP. De hecho, a esta edad era ya patente la existencia de "torpedos" (Fig. 20). Estas estructuras pueden identificarse tanto por inmunohistoquímica como por microscopía electrónica (Fig. 20 A-C), y consisten en acumulaciones de neurofilamentos y organelas -sobre todo mitocondrias- en los axones de las CP, que se manifiestan como engrosamientos con una forma esférica o fusiforme en las zonas cercanas al final del segmento inicial (Fig. 20 B-C).

En las dendritas observamos distintas patologías (Fig. 21), como la densificación y el colapso de orgánulos, el edema citosólico, la disolución del citoesqueleto y la agregación mitocondrial. El edema citosólico de las dendritas podía llegar a alcanzar un gran calibre, siendo observable claramente a microscopía óptica (Fig. 21 A-C). Hay que indicar que en las dendritas de las CP, incluso aquéllas que presentaban un grado avanzado de degeneración, el elemento presináptico no parecía mostrar alteraciones (Fig. 21).

Todas estas alteraciones se observan más comúnmente en las CP del ratón PCD a partir de P20, puesto que muchas de las CP a esta edad ya presentan algunas alteraciones que hemos descrito; sin embargo, estos resultados demuestran que a partir de P15 la citología de algunas CP comienza a mostrar signos patológicos.

Análisis del núcleo celular

Una vez estudiados los cambios morfológicos que sufrían las CP durante el proceso pre-neurodegenerativo y neurodegenerativo en el citoplasma, dendritas y axones, centramos nuestro estudio en el análisis del estado de los distintos compartimentos nucleares de las CP del ratón mutante PCD. Para realizar este tipo de estudios empleamos los disociados de CP, que permiten estudiar la organización nuclear de esta población neuronal. Este procedimiento que ya ha sido descrito previamente (ver Material y Métodos) permite una preservación excelente de la morfología y la organización citológica del soma de las CP,

además de permitir analizar con mayor resolución los posibles cambios que puedan ocurrir a nivel nuclear.

Territorios cromosómicos

ADN telomérico

El ADN telomérico está integrado por secuencias no codificantes de ADN que exhibe una configuración de cromatina condensada característica de regiones genómicas reprimidas (Louis y Vershinin, 2005). En el presente trabajo de Tesis Doctoral estudiamos el patrón de expresión de este tipo de heterocromatina constitutiva. Para abordar este análisis utilizamos el método de la hibridación *in situ* para detectar los extremos terminales de los cromosomas, donde se organizan las unidades repetidas en tándem del ADN telomérico (Fig. 22). En las CP de los ratones control la señal de hibridación del ADN telomérico aparecía formando pequeños focos redondeados y bien definidos distribuidos por todo el nucleoplasma (Fig. 22 A). En cambio, las CP del ratón PCD muestran alteraciones en este tipo de cromatina, ocurriendo un proceso progresivo de agregación del ADN telomérico (Fig. 22 B-D).

Estado general de la cromatina: daño y reparación

Como ya hemos descrito en la Introducción, uno de los factores que desencadena la muerte celular en distintos procesos neurodegenerativos es la aparición de focos de lesión en el ADN. Analizamos si este tipo de alteración precede a la muerte neuronal de las CP.

Daño en el ADN

Durante los procesos en los que ocurren daños en la estructura del ADN, la variante de la histona H2A, la H2AX, se fosforila (γ-H2AX) y se sitúa flanqueando y señalizando las zonas donde aparecen los focos de lesión. Estudiamos si las CP de los ratones mutantes PCD sufrían esta alteración, para lo que realizamos la inmunocitoquímica contra la γ-H2AX. Las CP de los animales control, como cabía esperar, no mostraban marcaje definido para γ-H2AX (Fig. 23 A-C). Por el contrario, las CP de los animales PCD exhibían un número diverso de focos nucleares inmunorreactivos para γ-H2AX (Fig. 23 D-O). Estos focos nucleares positivos para γ-H2AX se acumulaban progresivamente alrededor de las masas de cromatina, que son cada vez más grandes. A P15 no detectamos CP que mostraran este tipo de daño, mientras que a P20 encontramos numerosas CP que presentan diferentes grados de lesión del ADN, por lo que se escogió esta edad para ilustrar este signo patológico pre-neurodegenerativo (Fig. 23). Además, al contrateñir las muestras pudimos observar el patrón de expresión de la lesión en el núcleo de las CP. Los focos de daño se localizaban preferentemente en la periferia de las masas de cromatina condensada y en la periferia del núcleo, excluyéndose siempre del nucleolo (Fig. 23 D-O).

También analizamos más en profundidad el proceso que desencadenaba la muerte de las CP en el ratón mutante PCD. Para ello empleamos la técnica de TUNEL, que permite

identificar las células que han entrado en un proceso de muerte neuronal por apoptosis (Fig. 24). Comenzamos a detectar cuerpos TUNEL+ en la CP de los animales PCD a partir de P18, siendo más numerosos a partir de P20 (Fig. 24 A-O). El tamaño de los focos TUNEL+ aumentaba progresivamente, reflejando un daño en la CP cada vez más severo, lo que estaba relacionado directamente con el aumento de los focos de señalización de rotura del ADN (Fig. 24 C, F, I, L, O). En lo que consideramos los estadios finales del proceso neurodegenerativo, los focos TUNEL+ se agregaban entre ellos hasta formar una gran masa TUNEL+ en la CP (Fig. 24 M-O). La combinación de la técnica de TUNEL con la inmunocitoquímica para la γ-H2AX nos permitió analizar la relación entre la aparición de focos de rotura del ADN con la entrada de las CP en apoptosis. Al igual que se observaba en la figura anterior con los cuerpos de cromatina (Fig. 23), se podía ver que los focos de lesión marcados con la γ-H2AX se situaban alrededor de los cuerpos TUNEL+. En definitiva, las CP que eran TUNEL+/γ-H2AX+ se encontraban en un proceso de muerte celular irremediable. Sin embargo, las CP TUNEL-/γ-H2AX+ (Fig. 24 A-C) en principio son potencialmente salvables por los sistemas de reparación del ADN propios del núcleo.

Sistemas de reparación del ADN

Para analizar la respuesta de los sistemas de reparación del ADN ante la aparición de focos de lesión en las CP del ratón mutante utilizamos la inmunocitoquímica en los disociados de CP para la 53BP1 y la pATM (proteínas que intervienen en los mecanismos de señalización/reparación del ADN). Además, también estudiamos mediante hibridación de *microarrays* el grado de expresión génica de los genes implicados en la síntesis de las principales proteínas implicadas en los sistemas de señalización/reparación del ADN.

Los resultados obtenidos mediante la técnica inmunocitoquímica mostraron que existe una activación tanto de la 53BP1 como de la pATM ante la aparición de focos de lesión en el ADN (Fig. 25). Además, el análisis de la expresión génica demostró un aumento significativo del nivel de transcripción de genes que sintetizan proteínas de la ruta de señalización/reparación del ADN en el cerebelo de los ratones mutantes PCD (Tabla 12).

Tabla 12. Análisis de expresión diferencial de genes implicados en los mecanismos de señalización/reparación del ADN y que presentan un incremento en su nivel transcripcional en el cerebelo del ratón PCD. ** $p<0.01$

Gen	Cambio	*p* valor
Ataxia telangiectasia mutated homolog human (Atm)	+ 1.4	0.001 **
Breast cancer 1 (Brca1)	+ 1.5	0.022
DNA cross-link repair 1A, PSO2 homolog (Dclre1a)	+ 1.6	0.016
Meiotic recombination 11 homolog A (Mre11a)	+ 1.8	0.006 **
RAD50 interactor 1 (Rint1)	+ 2.0	0.001 **
Transformation related protein 53 binding protein 1 (53BP1)	+ 2.4	0.002 **

Normalmente, cuando una célula sufre lesiones en el ADN la proteína γ-H2AX señaliza la zona donde se localiza esa alteración, y las proteínas reparadoras se sitúan en esa región con el fin de realizar su función (Valero et al., 2006). Sorprendentemente, ni la proteí-

na reparadora 53BP1 (Fig. 25 C-F-I) ni la pATM (Fig. 25 L-O-R) se localizaban en los focos de rotura señalizados por la γ-H2AX. Es decir, las proteínas reparadoras no se reclutaban en los focos de lesión del ADN de las CP del ratón mutante PCD y, por lo tanto, existía un déficit organizativo en los sistemas de reparación del ADN en las CP del ratón PCD.

Heterocromatinización de la célula de Purkinje

Para analizar el grado de empaquetamiento de la cromatina en las CP del ratón PCD estudiamos el patrón de expresión de la histona H4-K20-3Me en los animales P20 (Fig. 26). La trimetilación en la lisina 20 de la histona H4 es una modificación postraduccional que se requiere para la represión génica mediada por la heterocromatina facultativa. A mayor grado de expresión de esta proteína, mayor empaquetamiento de la cromatina y, por lo tanto, mayor silenciamiento génico. En el núcleo de las CP de los animales control sólo aparecían pequeños agregados de heterocromatina positivos para H4-K20-3Me, normalmente localizados alrededor del nucleolo (Fig. 26 A-C). Por el contrario, en las CP de los ratones PCD se observaban grandes masas perinucleolares de heterocromatina, y otros agregados positivos para H4-K20-3Me distribuidos por todo el núcleo, cuyo tamaño aumentaba de forma progresiva reflejando un mayor empaquetamiento de la cromatina (Fig. 26 D-F). La combinación de la técnica inmunocitoquímica para la γ-H2AX junto con la de H4-K20-3Me demostró que este proceso de represión transcripcional era previo a la aparición de los focos de lesión en la estructura del ADN (Fig. 26 D-I). Además, de nuevo comprobamos que el daño del ADN se localizaba en la periferia de estas grandes masas de cromatina condensada. Por lo tanto, en los estadios pre-neurodegenerativos del ratón mutante PCD existe un silenciamiento génico progresivo. Para completar este estudio se recurrió al análisis mediante microscopía electrónica, que corroboró fielmente los resultados obtenidos mediante la técnica inmunocitoquímica (Fig. 27). Más aún, los estudios de hibridación de microarrays del vermis del ratón PCD mostraban un incremento de la tasa transcripcional respecto al animal control, de dos genes directamente implicados en el proceso de heterocromatinización, la *caspasa 7* (+ 1.85) y el *Ddit3* (+ 1.9; del inglés: *DNA-damage inducible transcript 3*).

Dominios intercromatínicos

Localización del ARNm

La maduracion de los ARNm ocurre en los dominios intercromatínicos, en concreto en las fibrillas pericromatínicas. El último paso en la maduración de estos ARN consiste en la poliadenilación. Mediante hibridación *in situ* para la cadena de Poli(A) estudiamos el estado y la distribución de la mayoría de ARNm (puesto que los ARNm de las histonas no están poliadenilados; Kühn y Wahle, 2004) aunque también se detecta una fracción de ARN no codificante (Mattick, 2004). Por lo tanto, esta técnica permite detectar la población de ARN poli(A) total, que no se corresponde exactamente con la población del ARNm activo.

En las CP de los animales control el ARNm estaban distribuidos tanto en el núcleo (principalmente en la zona perinucleolar) como por todo el citoplasma (Fig. 28 A). Por el contrario, en las CP de los animales PCD, comenzaban a agregarse formando microfocos nucleares, mientras que en el citoplasma apenas aparecía marcaje. Esta disposición reflejaba la alteración que existe en la exportación del ARNm al citoplasma en las CP del ratón PCD (Fig. 28 B-D).

El nucleolo

Puesto que la organización estructural de los compartimentos nucleolares es muy sensible a los cambios en la tasa de transcripción de los genes ribosomales (ver Introducción), realizamos un análisis de este compartimento nuclear en animales P15, P20 y P25 mediante microscopía electrónica e inmunocitoquímica en disociados neuronales. Los resultados que presentamos son de animales P20, pero hay que señalar que las alteraciones que se observan en los ratones PCD a esta edad son ya perfectamente detectables a P15.

Las CP de los animales control presentaban nucleolos con una configuración reticular típica, con bandas nucleolares correspondientes a los componentes fibrilar denso y granular y numerosos centros fibrilares pequeños (Fig. 29 A). Estos centros fibrilares pequeños aparecían como áreas redondas de baja densidad electrónica rodeadas de componente fibrilar denso (Fig. 29 A). Sin embargo, los nucleolos de las CP de los ratones PCD presentaban distintos patrones de segregación nucleolar, con el componente fibrilar denso condensado y, en muchas ocasiones, localizado hacia la periferia nucleolar, e incluso en algún caso desaparecido (Fig. 29 B-F). Estos cambios se veían acompañados por una desorganización de los centros fibrilares (con tendencia a desaparecer), la generación de algunos centros fibrilares gigantes y la formación de masas prominentes de heterocromatina localizada en la zona perinucleolar. En conjunto, la mutación pcd produce una alteración muy severa en el nucleolo de las CP de los ratones mutantes PCD. En conclusión, estas alteraciones reflejan una disfunción de la transcripción de los genes ribosomales, y representan una marca nucleolar de cambios pre-degenerativos en las CP de los ratones PCD.

El cuerpo de Cajal

Ya que la transcripción y el procesamiento del ARN son procesos nucleares coordinados (ver Introducción), estudiamos si los cambios observados en las CP de los ratones PCD afectaban al compartimento nuclear relacionado con la maduración de factores de maduración del ARN, el CC.

Para la detección de los CC empleamos anticuerpos contra las proteínas coilina y fibrilarina. Este doble marcaje nos permitía analizar los cambios producidos en el CC en relación con las alteraciones nucleolares (Fig. 30). Los resultados mostraban en las CP control el componente fibrilar de los nucleolos bien definido, además de los CC típicos (Fig. 30 A). Sin embargo, los CC del ratón PCD presentaban distintas morfologías aberrantes (Fig. 30 B-F): entre ellas se encontraba un aumento del tamaño del CC respecto a los CC típicos

(Fig. 30 B), o la traslocación de la coilina al nucleolo (Fig. 30 C). Esta última alteración la detectamos en 1 de cada 3 CP del ratón PCD aproximadamente. También hemos observado la formación de anillos de coilina perinucleolares (Fig. 30 D-E). De hecho, análisis cuantitativos revelaron que aparecían casi 3 anillos perinucleolares de coilina por cada CP (2.71 ± 0.53; n=200). Por último, en lo que consideramos ya una fase tardía de la degeneración, aparecía una reminiscencia de coilina asociada a su vez a lo que queda del componente fibrilar del nucleolo (Fig. 30 F). Estas modificaciones estructurales estaban acompañadas de un descenso en el número de CC típicos. Los análisis cuantitativos demostraban que existía un descenso en el número de CC en las CP de los ratones PCD (Fig. 31). Esta reducción se hacía patente ya desde P15, siendo, por lo tanto, uno de los primeros signos preneurodegenerativos, pero era realmente acusada a P20 (Fig. 31). La desestructuración de los CC fue analizada a microscopía electrónica, donde se pudo comprobar la pérdida gradual de la morfología típica del CC (Fig. 32 A-D).

Degradación proteica: el proteasoma

Las vías de degradación intracelular de proteínas son numerosas y diferentes según la proteína, el tipo celular y la situación metabólica. El proteasoma se considera una de las principales vías implicada en estos procesos. En este trabajo de Tesis Doctoral hemos estudiado el grado de expresión de esta vía proteolítica en las CP del ratón PCD. Para ello analizamos el patrón de expresión del proteasoma 20S (Fig. 33). En los animales control se observaba un marcaje difuso del proteasoma 20S, homogéneamente distribuido por el nucleoplasma de la CP (Fig. 33 A). En cambio, en las CP de los ratones PCD aparecían agregados del proteasoma 20S tanto en el núcleo como en el citoplasma, que eran más grandes a medida que avanza el proceso degenerativo (Fig. 33 B-D). Además, mediante el análisis de hibridación de *microarrays* detectamos un incremento en la transcripción de genes que sintetizan proteínas implicadas en la vía del proteasoma (Tabla 13). Por lo tanto, el grado de degradación proteica, por la vía del proteasoma, era muy elevado en las CP del ratón mutante PCD.

Tabla 13. Genes implicados en la síntesis de proteínas que participan en la degradación proteica, vía proteasoma, que presentan un incremento en su nivel transcripcional en el cerebelo del ratón PCD.

Gen	Cambio	*p* valor
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 1 (Psmb1)	+ 1.47	0.025
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 2 (Psmb2)	+ 1.58	0.026
proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 10 (Psmb10)	+ 1.52	0.030
proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4 (Psme4)	+ 1.62	0.025
proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 11 (Psmd11)	+ 1.82	0.013

Activación de la glía en el ratón mutante PCD

En el presente trabajo de Tesis Doctoral estudiamos la respuesta de los tres elementos gliales ante el proceso neurodegenerativo que ocurre en determinados tipos neuronales en el ratón mutante PCD. Este análisis se ha centrado en la respuesta en el cerebelo durante el proceso degenerativo de las CP. Además, también hemos querido comparar el proceso que ocurre en el cerebelo con el que se experimenta en el BO durante la degeneración de las células mitrales.

La microglía en el cerebelo

Las técnicas que hemos empleado para el estudio de la activación de la microglía en el cerebelo de los ratones PCD son la técnica inmunohistoquímica, *western-blot*, microscopía electrónica e hibridación de *microarrays*.

Para la técnica inmunohistoquímica hemos empleado el anticuerpo contra la proteína Iba1 (proteína ligante de calcio) como marcador de la microglía en secciones sagitales de cerebelo de ratones P15, P20 y P25. En el cerebelo de los ratones control las células de microglía se encontraban dispersas a lo largo de todas las capas del cerebelo, aunque preferentemente se localizaban en la CG y en la SB (Fig. 34 A). El cuerpo celular de estas células era pequeño, con las neuritas finas y ramificadas (Fig. 34 E). A la microglía que presentaba este fenotipo, y que se encuentra de forma normal en el tejido nervioso, se le denomina microglía latente o microglía residente. A P15, en el cerebelo de los ratones mutantes PCD parece existir un pequeño incremento de la presencia de células de microglía, tanto en la SB como en la CG (Fig. 34 B). Además, en este estadio ya se comenzaban a observar algunos cambios morfológicos de la microglía, como el engrosamiento de sus ramificaciones (Fig. 34 F). A P20, las células de microglía del ratón PCD sufrían fuertes modificaciones morfológicas; es decir, aumentaba considerablemente el tamaño de su cuerpo celular y las prolongaciones poseían un mayor grosor y se acortaban (Fig. 34 G). Además, estas células comenzaban a situarse en la CCP y en la CM (Fig. 34 G). Por último, a P25 las células de microglía poseían un tamaño celular mucho mayor que las de microglía latente (Fig. 34 H) y se situaban en la CCP llegando a formar una monocapa, aunque también se detectaban en la CM (Fig. 34 D).

Quisimos analizar el proceso de activación de la microglía en relación con la pérdida progresiva de CP. Para ello realizamos una inmunohistoquímica doble para Iba1 y CB (Fig. 35). Se podía observar cómo las células de microglía activa se situaban en las zonas adyacentes a las CP que aún permanecían en el cerebelo del ratón PCD, pero que ya mostraban algún tipo de alteración. Una vez que la CP degeneraba, el espacio dejado por la neurona desaparecida -tanto en la CCP por la pérdida del soma como en la CM por la degeneración dendrítica- era ocupado por células microgliales (Fig. 35).

Las modificaciones morfológicas de la microglía se estudiaron también a microscopía electrónica durante el periodo degenerativo de las CP (Fig. 36). La microglía reactiva pre-

sentaba un cuerpo celular grande, con un núcleo eucromático, aunque con condensaciones perinucleares de cromatina (Fig. 36 C-E). En el citoplasma, estas células presentaban un gran número de mitocondrias y un RER muy bien desarrollado (Fig. 36 C). También se podía observar cómo la microglía reactiva se situaba englobando a las CP que se encontraban en degeneración (Fig. 36 C-E).

La detección de cambios en la morfología de las células microgliales no es suficiente para definir un estado reactivo de la microglía; también hay que analizar las modificaciones que ocurren en el sistema a nivel molecular. Para probar la existencia de activación de mecanismos moleculares que intervienen en la activación de la microglía analizamos los resultados de hibridación de *microarrays*. Comparamos el nivel de actividad transcripcional de los genes implicados en la respuesta inflamatoria mediada por la microglía entre el vermis de cerebelos de animales control y PCD.

Los resultados obtenidos mediante hibridación por *microarrays* demuestran que muchos de los genes implicados en la activación de la microglía aparecían sobreexpresados. Más aún, genes involucrados en la respuesta biológica que da la microglía reactiva, como la secreción de factores difusibles, la migración, la presentación antigénica o la fagocitosis presentaban aumentado su nivel transcripcional en el cerebelo del ratón PCD (Tabla 14). Hay que señalar que en el vermis del PCD hay genes implicados en la activación de la microglía que no muestran diferencias con los animales control en su tasa transcripcional. En ningún caso hemos encontrado represión transcripcional en genes directamente relacionados con la activación de la microglía.

Tabla 14. Análisis de expresión diferencial de genes implicados en la activación glial. ** $p<0.01$

Gen	Cambio	*p* valor
Activación de la microglía por ATP		
purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 3 (P2xr3)	+ 4.10	0.020
Activación de la microglía por lipopolisacáridos		
Lipopolysaccharide binding protein (lbp)	+ 1.58	0.030
Mitogen-activated protein kinase 1 (Mapk1; also known as Erk)	+ 1.82	0.013
Mitogen-activated protein kinase 14 (Mapk14; also known as p38)	+ 1.87	0.017
Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)	+ 1.40	0.046
Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 2	+1.30	0.006 **
Single immunoglobulin and toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain	+ 1.98	0.020
Secreción de factores pro-inflamatorios		
Chemokine (C-C motif) ligand 21a (Ccl21a)	+ 2.1	0.022
Chemokine (C-C motif) ligand 12 (Ccl12)	+ 15.1	0.006 **
Chemokine (C-C motif) ligand 3 (Ccl3)	+ 47.0	0.045
Chemokine (C-X-C motif) ligand 11 (Cxcl11)	+ 2.6	0.046
Interleukin 1 receptor accessory protein-like 1 (Il1rapl1)	+ 1.92	0.025
Interleukin 6 (Il6)	+ 1.48	0.001 **
Interleukin 10 receptor, beta (Il10rb)	+ 1.45	0.01
interleukin 1 receptor antagonist (Il-1ra)	+1.52	0.043

Interferon alpha responsive gene (Ifrg15)	+ 1.93	0.001 **
Interferon inducible GTPase 2	+ 9.02	0.025
interferon regulatory factor 8	+ 3.73	0.037
Interferon-related developmental regulator 2	+ 2.27	0.025
Interferon gamma induced GTPase	+ 5.96	0.008 **
Migración celular		
Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived) (Ecgf1)	+ 2.91	0.035
Endotelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3 (edg3)	+ 1.5	0.037
Integrin beta 2	+ 2.05	0.030
Fagocitosis		
CD36	+ 1.41	0.020
RAR-related orphan receptor alpha (Rora)	+ 1.87	0.020
Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (Ror1)	+ 1.30	0.045
Presentación antigénica		
CD200 receptor 1 (Cd200r1)	+ 2.73	0.030
CD80	+ 7.30	0.030
C1q domain containing 2 (C1qdc2)	+ 1.45	0.025
Stomatin (Stom)	+ 1.49	0.045
Thrombospondin 1 (Thbs1)	+ 1.49	0.008 **

Otra de las consecuencias de la activación de la microglía es la producción de óxido nítrico mediada por la isoforma inducible del enzima óxido nítrico sintasa (iNOS; del inglés: *inducible Nitric Oxide Synthase*). Estudios previos han demostrado que en el cerebelo del ratón mutante PCD existe una sobreexpresión de este enzima (Kyuhou et al., 2006). La liberación de este gas puede producir la formación de radicales libres provocando, entre otras alteraciones, la nitrosilación de proteínas o alteraciones en la señalización de GMPc. En el presente trabajo de Tesis Doctoral analizamos si existía un aumento de la nitrosilación de proteínas en el vermis del ratón mutante PCD mediante el marcaje con 3-nitrotirosina. Nuestros resultados demuestran que existía un aumento de la nitrosilación de proteínas del vermis del cerebelo del ratón mutante PCD (Fig. 37 A).

Además, analizamos el nivel de expresión del enzima guanilato ciclasa, que se encarga de la síntesis del GMPc y que es una de las dianas del óxido nítrico. Los resultados obtenidos por hibridación de *microarrays* demuestran que este enzima se encuentra sobreexpresado en el cerebelo del ratón PCD (+1.94; *p* valor=0.002). Esta situación se corroboró por estudios de inmunohistoquímica. Mientras que en el animal control la isoforma soluble del enzima apenas marca elementos reconocibles con la microscopía confocal, ya en el animal mutante PCD de P18 las CP y otras células de la CG muestran una clara señal inmunohistoquímica (Fig. 37 B-C).

La astroglía en el cerebelo

En situaciones en las que ocurre neurodegeneración otro elemento glial, los astrocitos, puede ser también activado. Además, se sabe que durante la activación de la microglía, ésta tiene la capacidad de activar los astrocitos, incrementando así la respuesta inflamatoria (Garden y Möller, 2006). Para analizar si existía astrogliosis durante la degeneración de las CP, utilizamos la técnica inmunohistoquímica contra la GFAP. Este componente del citoesqueleto sufre un fuerte cambio estructural durante la activación de los astrocitos. Además, combinamos la inmunohistoquímica para la GFAP junto con la detección de Iba1 para relacionar la activación de la microglía y la de los astrocitos (Fig. 38). En el animal control, el marcaje para la GFAP muestra principalmente la glía de Bergmann en empalizada ascendiendo por la CM desde la CCP (Fig. 38 A-C), aunque existe un pequeño número de astrocitos dispersos por todas las capas de la corteza. Ya a P15 se puede observar un aumento de la inmunorreactividad para la GFAP en el cerebelo del ratón PCD, principalmente en la piamadre y en la CG, (Fig. 38 D). Esta activación se hace más patente a P20, aumentando a P25 (Fig. 38 G-J). Los astrocitos sufren una hipertrofia, al igual que ocurre con la microglía, y forman una especie de barrera glial en la zona más externa de la CM y en la CCP (Fig. 38 L), demarcando así la zona dañada. Este proceso ocurre de manera concomitante con la activación de la microglía (Fig. 38).

Al igual que sucede con la microglía, existen determinados genes que codifican proteínas que se expresan de forma específica durante el proceso de astrogliosis. El análisis por hibridación de *microarrays* demostró la sobreexpresión de muchos de ellos en el vermis del ratón PCD (Tabla 15).

Tabla 15. Análisis de expresión diferencial de lo genes implicados en astrogliosis que muestran expresión diferencial en el cerebelo del ratón PCD. ** $p<0.01$

Gen	Cambio	*p* valor
Cathepsin L (Ctsl)	+ 2.22	0.030
Fibronectin 1 (Fn1)	+ 3.63	0.045
Neurofibromatosis 1 (Nf1)	+ 3.08	0.002 **
Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2 (Nfatc2)	+ 2.15	0.004 **
Prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2)	+ 2.42	0.008 **
Signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3)	+ 1.62	0.013
Suppressor of cytokine signaling 3 (Socs3)	+ 1.38	0.031
Transforming growth factor alpha (TGF-)	+ 1.50	0.030

La oligodendroglía en el cerebelo

En la presente Tesis Doctoral también analizamos el patrón de expresión del tercer elemento glial, los oligodendrocitos. Este estudio lo realizamos mediante inmunohistoquímica para el factor de transcripción Olig2 (Fig. 39). En los animales control los oligodendrocitos se encontraban principalmente en la SB y en la CG, aunque también apa-

recían de forma mucho más restringida en la CCP y en la CM (Fig. 39 A). En cambio, en el cerebelo de los animales mutantes PCD parecía existir un número menor de oligodendrocitos a partir de P25. Para analizar si la desaparición de las células Olig2+ era debida a una pérdida de la expresión de este factor de transcripción o bien era consecuencia de la muerte de este tipo glial, combinamos la técnica de TUNEL con la inmunohistoquímica para Olig2. Nuestros resultados demostraron en el cerebelo del ratón mutante PCD existía muerte por apoptosis de los oligodendrocitos (Fig. 39 E-G). Hay que señalar que en los oligodendrocitos doblemente teñidos el marcaje para Olig2 estaba ya muy reducido, lo que hace suponer que la expresión de este factor de transcripción se reduce con anterioridad a la entrada en apoptosis. Puesto que los oligodendrocitos tienen como función principal la de mielinizar los axones, estudiamos el estado de la mielina en la corteza cerebelosa del ratón PCD mediante la inmunohistoquímica contra la MBP (del inglés: *Myelin Basic Protein*; Fig. 39 H-J). En el cerebelo del PCD se observan alteraciones en los axones ya desde P15 (Fig. 39 I). A P25 la pérdida de axones se refleja en la disminución del grosor de la SB, en un patrón de expresión aberrante de los axones que se encuentran en la CG, que aparecen con "torpedos" incluso mielinizados (Fig. 39 I-J).

La glía en el bulbo olfatorio

Otro aspecto que analizamos en el presente trabajo de Tesis Doctoral fue la respuesta glial durante la degeneración de las células mitrales de los ratones PCD, que ocurre en un periodo más tardío que la de las CP (P60-P90). En primer lugar analizamos la respuesta de la **microglía** ante el proceso de muerte de las células mitrales. En el animal control la microglía residente se encontraba repartida de forma homogénea por todas las capas bulbares (Fig. 40 A). Al igual que en el cerebelo, estas células mostraban un cuerpo celular pequeño con numerosas ramificaciones finas y alargadas. En cuanto al BO de los ratones PCD, detectamos que durante la degeneración de las células mitrales existía una activación de la microglía (Fig. 40 B-D). Sin embargo, esta reacción difiere notablemente de la que observábamos en el cerebelo. Aunque sí mostraban cambios morfológicos, la hipertrofia de las células de microglía no era tan acusada como en el cerebelo (Fig. 40 E-H), y no se detectaba una migración tan clara de estas células hacía la capa de las células mitrales: las células de microglía reactiva seguían repartidas de forma más o menos homogénea en el BO en todas las edades estudiadas (Fig. 40 B-D).

En cuanto a los **astrocitos**, la inmunohistoquímica contra la GFAP mostraba que éstos se situaban en la capa glomerular y capa de los granos en los animales control, aunque también se pueden ver algunos en la capa de las células mitrales (Fig. 41 A-C). En el ratón mutante PCD ya se detecta en estadios muy iniciales de la degeneración (P50) un aumento del número de astrocitos (Fig. 41 D-F). Sin embargo, a medida que avanzaba la etapa degenerativa de las células mitrales no se observaba un cambio drástico en la respuesta astroglial en los animales PCD de P70 y P90 en comparación con los de P50 (Fig. 41 G-L). Más aún, a diferencia de lo que ocurría en el cerebelo, esta astrogliosis era homogénea a lo largo de

todas las capas bulbares, sin observarse una delimitación de la zona dañada por parte de los astrocitos tan clara como la que se detectaba en el cerebelo.

Por último, el análisis del patrón de expresión de los **oligodendrocitos** en el BO de los animales control reveló que éstos aparecían dispersos a lo largo de todas las capas bulbares, aunque se localizaban preferentemente en la zona de la SB y la CG (Fig. 42 A). Este patrón de expresión se mantenía en el BO de todos los ratones PCD de las distintas edades analizadas (Fig. 42 B-F), no pareciendo existir variaciones en el número de oligodendrocitos entre el animal control y los mutantes PCD. De hecho, la combinación de la técnica de TUNEL con la inmunohistoquímica para Olig2 no mostró elementos doblemente marcados en ningún mutante PCD en las edades analizadas (datos no ilustrados).

Estudio del nivel de expresión del gen nna1

La hibridación de *microarrays* permitió comparar la tasa de nivel transcripcional del gen *nna1* en el vermis de animales control y PCD P20. En principio cabría esperar que no existiera expresión de ningún tipo del ARNm de este gen en el vermis del ratón PCD. Sin embargo, existía una pequeña actividad transcripcional de este gen, aunque sí que mostraba una fuerte represión cuando se comparaba con el animal control (-4.08; p valor = 0.003). Mediante la técnica de RT-PCR hemos analizado el nivel de expresión del gen *nna1*, en el cerebelo y el BO de animales control, durante los periodos que ocurre la degeneración de las CP y las células mitrales, concretamente a P10, P15, P20, P25, P50, P60, P70 y P80. Para este estudio se diseñaron unos cebadores que permitieran amplificar específicamente el mayor de los transcritos del gen *nna1* (nna1Tr1) y, además, otro que permitía amplificar los 3 transcritos que codifica el gen *nna1* (nna1TrTot). Como se muestra en la gráfica 6, los resultados demuestran que en el cerebelo existe un pico de expresión tanto de nna1Tr1 como de nna1TrTot entre P15 y P25, mientras que a P50 su nivel de expresión disminuye de forma significativa, manteniéndose hasta P80 (Fig. 43). Además, a P20 el nivel de expresión de nna1TrTot es superior que el de nna1Tr1 (* p<0.05); por lo tanto, se puede concluir que en el cerebelo se expresa de forma mayoritaria nna1Tr1, aunque también existe expresión bien de uno o bien de los otros dos transcritos. Por el contrario, en el BO, el nivel de expresión de nna1Tr1 y nna1TrTot se mantenía constante desde P10 hasta P80, aunque hay que señalar que el nivel de expresión de nna1TrTot es ligeramente mayor que nna1Tr1, al igual que ocurría en el cerebelo. Entre P15 y P25 las diferencias de expresión de nna1Tr1 y nna1TrTot entre cerebelo y bulbo son altamentes significativas (## p< 0.01). Como control negativo empleamos ARN del vermis de ratones mutantes PCD. Aunque el nivel de expresión es mucho más reducido que en los animales control, sí hemos detectado una pequeña expresión de ARNm del gen *nna1*, por lo tanto; en el ratón mutante PCD existe una mínima transcripción del gen *nna1*, estando en consonancia con los resultados observados en los *microarrays*.

Estudio de las tubulinas en el cerebelo

Como hemos descrito en la "Introducción", trabajos recientes han propuesto que la proteína Nna1 pudiera participar en modificaciones postraduccionales de las tubulinas. Es por ello que analizamos el patrón de expresión de estas proteínas del citoesqueleto en el cerebelo de animales control y PCD. A continuación, pasamos a exponer los resultados obtenidos referentes al análisis del estado de la α y la β tubulinas.

Una primera aproximación al estudio de las tubulinas en el cerebelo del ratón mutante PCD la realizamos mediante estudios de hibridación por *microarrays*. Este análisis mostraba que no existían diferencias en la mayoría de genes implicados en la síntesis de las distintas isoformas de las tubulinas. Sin embargo, si encontramos algunos genes que mostraban una represión transcripcional en comparación con el animal control (Tabla 16).

Tabla 16. Análisis de expresión diferencial de los genes implicados en la astrogliosis que muestran expresión diferencia en el cerebelo del PCD.

Gen	Cambio	*p* valor
Tubulin, alpha 1C (Tuba1C)	- 1.60	0.020
Tubulin, alpha 3A (Tuba3A)	- 1.44	0.045
Tubulin, alpha 4A (Tuba4A)	- 1.50	0.031
Tubulin, alpha 8 (Tuba8)	- 1.40	0.030
Tubulin alpha, related sequence 1 (Tuba-rs1)	- 1.94	0.046
Tubulin, beta 2C (Tuba2C)	- 2.1	0.045
Tubulin, beta 6 (Tubb6)	- 1.8	0.020

Estudio de la expresión de la β-tubulina

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos analizado el patrón de expresión de la β-tubulina en el cerebelo de ratones control y ratones PCD P15, P20 y P25. En los animales control la β-tubulina se expresa tanto en el soma como en las dendritas de las CP (Fig. 44). En el ratón mutante PCD se observaba una expresión menor de esta proteína del citoesqueleto en las CP. Para analizar si esta expresión reducida era consecuencia de la propia muerte de las CP o bien era una perdida de expresión *per se*, realizamos la doble inmunohistoquímica para la CB y la Tuj1 (Fig. 44). Los resultados obtenidos demostraron que cuando las CP todavía no han muerto existe una pérdida progresiva de expresión de la β-tubulina, comenzando por el soma y continuando por las dendritas (Fig. 44 D-I). A medida que avanza el grado de neurodegeneración aparecen marcados otros elementos neuronales positivos en todas las capas cerebelosas (Fig. 44).

Estudio de la expresión de la α-tubulina

Recientemente se ha postulado que la proteína Nna1 podría estar implicada en una modificación postraduccional de la α-tubulina, en concreto, en el ciclo de tirosinación/destirosinación de ésta (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Por ello hemos analizado

el patrón de expresión de los 3 grados distintos de tirosinación/destirosinación de la α-tubulina en el cerebelo de ratones control y PCD.

Expresión de α-tubulina tirosinada

En primer lugar analizamos el patrón de expresión de la forma tirosinada de la α-tubulina (Tyr-Tub) en el cerebelo de ratones control y ratones mutantes PCD (Fig. 45). En el cerebelo de los animales control, la Tyr-Tub se expresa en las dendritas de las CP y en las prolongaciones de la glía de Bergmann (Fig. 45). Sin embargo, ni el soma de las CP ni el cuerpo celular de la glía de Bergmann eran inmurreactivos para esta proteína (Fig. 45 A-B). De hecho, no aparecía ningún otro elemento neural positivo para la Tyr-Tub en el cerebelo de los animales control. En el animal mutante PCD, el patrón de expresión de la Tyr-Tub no difería del que exhibe el ratón control en ninguna de las edades analizadas (Fig. 45 D-E). Ni en los animales control ni en los mutantes se observaron otros elementos neurales positivos para la Tyr-Tub.

Expresión de α-tubulina destirosinada

El siguiente paso fue analizar el patrón de distribución de la forma destirosinada de la α-tubulina (Glu-Tub). En los animales control, las fibras de la glía de Bergmann eran también positivas para la Glu-Tub, aunque, a diferencia de lo que ocurre en el caso de la Tyr-Tub, existía una fuerte expresión de Glu-Tub en la CG. Además, hemos observado que en la CM se marcaban fibras que ascendían desde la CG, y que trabajos previos han identificado como fibras paralelas (Fig. 46 A-C-E). Este patrón de expresión no variaba en el cerebelo del ratón control P15 respecto a los de P20 y P25 (Fig. 46 A-C-E). Ni el soma ni las dendritas de las CP son inmunorreactivas para la Glu-Tub (Fig. 46 I). Tampoco el cuerpo celular de la glía de Bergmann (Fig. 46 G-I). En el caso del ratón mutante PCD, en todas las edades analizadas, se observaba un mayor grado de expresión de la proteína Glu-Tub en las fibras en empalizada de la glía de Bergmann comparado con el control (Fig. 46 B-D-G-H). A P25, en el ratón PCD además de conservarse el patrón de expresión observado a P15 o P20 aparecen algunas células situadas en la CM que comienzan a expresar la Glu-Tub (Fig. 45 F).

Expresión de Δ-tubulina

La escisión del resto de Glu que queda en el extremo C-terminal de la Glu-Tub conduce a la formación de la forma no tirosinable de la α-tubulina, la Δ-Tub. En los animales control, el patrón de expresión de esta proteína varía de P15 a P25 (Fig. 47 A-C-E). A P15 sólo se observaba marcaje para la Δ-Tub en la CG, mientras que no se detectaba inmunorreactividad ni en la CCP ni en la CM (Fig. 47 A). A partir de P20 se empezaba a detectar la expresión de esta proteína del citoesqueleto en el soma de las CP y algunas de sus dendritas (Fig. 47 C). A P25 aparece una mayor inmunorreactividad para esta proteína tanto en el soma como en las dendritas de la mayoría de las CP (Fig. 47 E).

En cuanto a la expresión de la Δ-Tub en el cerebelo del ratón PCD, esta proteína se localiza tanto en el soma como en el árbol dendrítico de las CP ya desde P15, además de marcar elementos neurales también de forma intensa en la CG (Fig. 47 B). Este patrón de distribución se mantiene a P20 y en las CP que permanecen a P25 (Fig. 47 D). Más aún, a P25 tanto en animales control como en mutantes (Fig. 47 E-F) comienzan a aparecer interneuronas que expresan Δ-Tub en la CM (Fig. 47 F).

Anticuerpo contra Nna1

El anticuerpo policlonal desarrollado para la detección de la proteína Nna1 fue testado utilizando la técnica inmunohistoquímica (tanto en tejido congelado como en tejido en parafina), inmunocitoquímica en disociados neuronales y por *western-blot*. No se obtuvieron resultados satisfactorios con ninguna de las técnicas empleadas.

ICONOGRAFÍA

Figuras 16-47

Discusión

En esta sección analizaremos los resultados obtenidos, planteando explicaciones sobre las posibles causas que desencadenan la muerte de las CP, así como nuevas hipótesis de trabajo para futuros estudios. Para facilitar el seguimiento y la compresión de esta sección se seguirá el mismo esquema que en el apartado anterior. Esta discusión se dividirá en tres grandes bloques: en el primero analizaremos el patrón de degeneración de las CP en el cerebelo del ratón PCD y las alteraciones citológicas que suceden en la etapa degenerativa y pre-neurodegenerativa prestando especial atención al núcleo celular. En segundo lugar discutiremos el papel de la glía en la degeneración de las CP y de las células mitrales del ratón PCD. Por último, analizaremos los datos obtenidos acerca del patrón de expresión de la β- y α-tubulina en sus distintas formas de tirosinación/destirosinación, y la repercusión que tienen los resultados obtenidos en la hipótesis formulada acerca de la función de la proteína Nna1.

Pre-degeneración y degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo del ratón PCD

Numerosos trabajos han estudiado el marco temporal en el que ocurre la degeneración de las CP en el ratón PCD (Mullen et al., 1976; Landis y Mullen, 1978; Fernández-González et al., 2002; Wang et al., 2006). A diferencia de lo que ocurre con el resto de las neuronas afectadas por la mutación del gen *nna1*, la muerte de las CP es muy rápida, desarrollándose en un periodo temporal muy corto (Landis y Mullen, 1978; O´Gorman, 1985; Fernández-González et al., 2002; Valero et al., 2006). Curiosamente, en el lóbulo cerebeloso X la muerte de las CP está ralentizada respecto al resto ya que las CP localizadas en esta zona permanecen hasta P50 e incluso P60 (Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003). La muerte retardada de las CP situadas en la zona nodular del cerebelo se ha observado también en otros modelos animales que sufren la degeneración de las CP, como el ratón mutante *nervous*, el *toppler*, el *Niemann-Pick* o el *lurcher* (Wassef et al., 1987; Sarna et al., 2003; Duchala et al., 2004). Las causas concretas por las que en esta región cerebelosa existe un retardo en la muerte celular aún se desconocen, sin embargo, se han postulado algunas hipótesis para explicarlas.

A este respecto, se ha propuesto que debe de existir algún mecanismo neuroprotector que permita la supervivencia durante mayor tiempo a las CP en el lóbulo X (Wang y Morgan, 2007). Trabajos previos han sugerido que las CP que expresan la proteína Zebrin II son menos susceptibles ante un proceso neurodegenerativo (Wassef et al., 1987; Tolbert et al., 1995; Sarna et al., 2003; Duchala et al., 2004). Sin embargo, esta propiedad no se mantiene en todos los modelos animales que sufren degeneración de las CP. Por ejemplo, en el ratón mutante *nervous* todas las CP de la parte caudal del cerebelo expresan la proteína Zebrin II y, sin embargo, un grupo de éstas son las primeras en degenerar, aunque sí es cierto que las CP del lóbulo X son las que más sobreviven en este modelo (Wassef et al., 1987).

En el ratón mutante PCD ocurre lo mismo que en el *nervous,* la mayoría de las CP localizadas desde el lóbulo VI hasta el X expresan la proteína Zebrin II y, sin embargo, las únicas que sobreviven más tiempo son las localizadas en el lóbulo X (comunicación personal: Dr. Hawkes, Universidad de Calgary, Canadá). Por lo tanto, estos datos parecen indicar que, aunque la proteína Zebrin II pudiese conferir alguna propiedad neuroprotectora, ésta no debe ser la única causa que explique la mayor supervivencia de las CP de la zona nodular.

Muchas de las CP localizadas en el lóbulo X expresan basalmente altos niveles de la proteína de choque térmico Hsp25 (Armstrong et al., 2000, 2001). Recientemente se ha sugerido que esta proteína pudiera tener propiedades neuroprotectoras ante un proceso degenerativo (Lewis et al., 1999; Wagstaff et al., 1999; Armstrong et al., 2001). Sin embargo, se ha demostrado que existen CP de la zona nodular que no expresan ni la proteína Zebrin II ni la Hsp25, y que son igual de resistentes ante los procesos neurodegenerativos que aquéllas que sí las expresan (Sarna et al., 2003). Por ello, aunque pudiese exitir una implicación de estas proteínas en el incremento de la supervivencia de las CP, parece ser mucho más importante el hecho de su localización en la zona nodular.

Se ha demostrado que la llegada de fibras trepadoras a los distintos lóbulos cerebelosos depende del núcleo de la oliva inferior del que procedan (Voogd y Ruigrok, 1997). Además, existen procesos de exocitotoxicidad mediados por alteraciones funcionales de las fibras trepadoras que desencadenan la muerte por apoptosis de determinados grupos de CP (O´Hearn y Molliver, 1993). Por lo tanto, se ha propuesto en otros modelos animales que la muerte de determinados grupos de CP pudiera estar desencadenada por una función anormal de las fibras trepadoras que llegan desde determinados núcleos (Welsh et al., 2002). Las fibras trepadoras que llegan al lóbulo X se originan en núcleos distintos a los del resto del cerebelo (Ito, 2006). Aunque en el ratón PCD no se ha descrito ningún proceso citotóxico mediado por un desajuste funcional de las fibras trepadoras, no debemos descartar la posibilidad de tal disfunción diferencial entre distintos lóbulos, de manera que se pudiera ver afectado en menor medida el lóbulo X. En resumen, la mayor supervivencia de las CP de la zona nodular en distintos modelos animales de neurodegeneración podría ser debida a una suma de al menos dos: una buena funcionalidad de las fibras trepadoras que contactan con las CP, en combinación con factores intrínsecos de las CP, como la expresión de las proteínas Zebrin II y/o la Hsp25 (Sarna et al., 2003).

Alteraciones de la célula de Purkinje

Éste es el primer trabajo donde se ha estudiado la capacidad motora de los animales mutantes PCD a edades previas a la pérdida de las CP. En concreto, nuestros resultados han demostrado, mediante el *test* del Rota-rod, que el ratón mutante PCD de P15 tiene una habilidad motora mucho menor que la de los animales control (Fig. 4 F). Por lo tanto, el ratón mutante PCD muestra un fenotipo patológico de origen cerebeloso antes de que comience la muerte de las CP. Las CP de estos animales seguramente presentan alteracio-

nes funcionales previas a su muerte. Por ello, las edades de elección para la realización de los estudios de pre-neurodegeneración han sido P15 y P20, puesto que a esta última edad se encuentran numerosas CP que presentan distintos grados del estado neurodegenerativo, y antes de esa edad no está completamente articulado el circuito cerebeloso (Sotelo, 2004). Las alteraciones que hemos detectado en estos estadios son las que hemos denominado como signos pre-neurodegenerativos.

Alteraciones citoplasmáticas

Comenzaremos analizando las alteraciones observadas en el citoplasma de la CP. Los primeros estudios ultraestructurales mostraban como rasgo más característico la progresiva desestructuración del RER de las CP del ratón PCD desde P15 (Landis y Mullen, 1978). Como consecuencia, se generaban numerosos ribosomas libres que se localizaban principalmente en el polo basal de las CP (Landis y Mullen, 1978). La alteración del RER en las CP del ratón PCD ha sido analizada posteriormente mediante técnicas de Biología Molecular (Kyuhou et al., 2006). Se ha demostrado que existe un incremento de los sustratos relacionados con el estrés del RER, como la caspasa 12, la proteína CHOP o la chaperona BiP (específica del RER y que refleja un fallo en el plegamiento correcto de las proteínas; Kyuhou et al., 2006). Nuestro análisis ultraestructural corrobora las observaciones anteriormente descritas (Landis y Mullen, 1978). Además, nuestro estudio por hibridación de *microarrays* ha permitido detectar un incremento en la expresión de genes que comprometen la estabilidad del RER, por ejemplo, el *eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2* (PERK), el *endoplasmic reticulum to nucleus signalling 1* (IRE1) o el *p38 MAPK*, entre otros. La alteración del RER está también presente en las etapas iniciales de la degeneración de las células mitrales en el ratón PCD (Valero et al., 2006) y de las neuronas talámicas (O´Gorman, 1985). Por lo tanto, la desestructuración del RER es uno de los primeros signos pre-neurodegenerativos que presentan las neuronas afectadas por la mutación pcd. Otra alteración que se ha detectado en las CP de ratones PCD de P15, es la presencia de inclusiones citoplasmáticas formadas por gruesos filamentos de material fibrilar condensado sobre una matriz menos densa, y que se han denominado nematosomas (Grillo, 1970; Landis y Mullen, 1978). Hasta el momento, poco más se conoce sobre el origen y consecuencia de este signo.

Alteraciones dendríticas

Los estudios llevados a cabo por Landis y Mullen (1978) describieron que tanto las dendritas como las cisternas del complejo hipolemal (retículo endoplásmico liso que se extiende a las dendritas) aparecían inalteradas en el PCD a P15. Sin embargo, nuestro estudio ha mostrado que en este estadio se comienzan a observar distintas alteraciones de las dendritas de las CP, incluyendo la acumulación de organelas, el edema citoplasmático y la agregación mitocondrial (ver Resultados). Además, los estudios iniciales habían descrito que, a partir de P18, las espinas dendríticas de las CP de ratones mutantes PCD carecían de elemento presináptico (Landis y Mullen, 1978). Sin embargo, nosotros hemos observado

cómo dendritas de las CP que están fuertemente afectadas, recibían sinapsis desde complejos presinápticos que no parecían mostrar alteración ninguna (ver Resultados). Por lo tanto, nuestro estudio ha revelado que las alteraciones dendríticas de las CP comienzan antes de lo que previamente se había descrito (Landis y Mullen, 1978). Estas variaciones coinciden con las que presentan las neuronas talámicas en los estadios inciales de su degeneración en el ratón PCD (O´Gorman, 1985).

Alteraciones axonales

Por último, los estudios previos describían el desarrollo normal de los axones de las CP del ratón PCD, no observándose alteraciones a edades previas al comienzo degenerativo de las CP (Landis y Mullen, 1978). En cambio, en el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos detectado cómo en el ratón PCD existe agregación de organelas y neurofilamentos en los axones de las CP ya desde P15. Este tipo de alteración es comúnmente conocido como "torpedo" y se ha observado en distintas enfermedades neurodegenerativas (Ertürk et al., 2007). Por lo tanto, la aparición de los torpedos es uno de los signos pre-neurodegenerativos que muestran las CP del ratón mutante PCD. No se ha analizado aún la presencia de esta alteración en el resto de las neuronas afectadas por la mutación pcd.

Alteraciones nucleares

Numerosos estudios han analizado los procesos que desencadenan la muerte de las neuronas afectadas por la mutación del gen *nna1* en el ratón PCD (Landis y Mullen, 1978; Blanks et al., 1982; O'Gorman, 1985; Kyuhou et al., 2006; Valero et al., 2006; Wang y Morgan, 2007). En un intento de ampliar el conocimiento del origen y las consecuencias de la mutación pcd, trabajos recientes han profundizado en el análisis del gen *nna1* y su posible función (Chakrabarti et al., 2006; Wang et al., 2006; Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Sin embargo, aunque se ha avanzado en este estudio, aún no se conocen con exactitud los fenómenos celulares y moleculares que ocurren como consecuencia de la ausencia de la proteína Nna1 y que constituyen los pasos iniciales en la degeneración de las CP. En el presente trabajo hemos analizado las alteraciones nucleares que ocurren en las CP del ratón PCD durante las etapas pre-neurodegenerativas y neurodegenerativas.

Alteraciones en la cromatina

Alteración del ADN telomérico

La principal función del ADN telomérico es el mantenimiento de la estabilidad del cromosoma (Blackburn, 1991). Estudiamos el patrón de expresión de este tipo de heterocromatina constitutiva en las CP durante el proceso degenerativo. Nuestros resultados han demostrado que existe una alteración progresiva del ADN telomérico a medida que avanza el estado degenerativo de las CP del ratón PCD, traduciéndose en una agregación teloméri-

ca y, probablemente, cambios profundos en los dominios cromosómicos individuales. Estas alteraciones reflejan que las CP presentan una gran inestabilidad genómica.

Las CP del ratón PCD presenta focos de lesión del ADN

En el presente trabajo de Tesis Doctoral hemos comprobado que la mutación pcd induce o, al menos, no previene la acumulación de focos de lesión en el ADN de las CP (ver Resultados). Este mismo hecho fue previamente observado durante la degeneración de las células mitrales en este mismo modelo animal (Valero et al., 2006). Sin embargo, hay que señalar que el patrón de focos de lesión que exhiben las células mitrales durante su proceso degenerativo difiere notablemente del que hemos observado en las CP. En las células mitrales del PCD los focos de rotura se presentan pequeños, bien definidos, y repartidos de forma homogénea por el nucleoplasma de la neurona (Valero et al., 2006). En cambio, en las CP del ratón PCD hemos detectado, de forma mayoritaria, grandes focos de lesión que se localizan preferentemente en la periferia de las masas de cromatina condensada y en la zona de la envuelta nuclear. Este patrón diferencial de expresión parece reflejar un mayor grado de lesión en el ADN de las CP que el que presentaban las células mitrales (Valero et al., 2006) lo que encajaría con el proceso de degeneración más rápido en las CP.

Los factores que desencadenan la aparición de focos de rotura del ADN son muy numerosos. De hecho, nuestros análisis por hibridación de *microarrays* han revelado que múltiples genes implicados en distintas vías que conducen al daño en el ADN aparecen sobreexpresados (receptores Fas, receptores de la superfamilia del factor de necrosis tumoral o complejos de la citocromo c oxidasa, entre otros). Esto se debe, presumiblemente, a la pérdida de expresión del gen *nna1*.

Se ha relacionado la gran vulnerabilidad de las células mitrales con respecto a las lesiones en el ADN con su alta actividad metabólica y bioeléctrica (Friedman y Strowbridge, 2000; Lowe, 2003; Djurisic et al., 2004; Granados-Fuentes et al., 2004). Esta actividad alta requeriría una tasa transcripcional elevada, que implicaría que la cromatina se encontrase en configuración eucromática. La configuración de la cromatina más abierta (eucromatina) haría que las células mitrales fueran más vulnerables a los agentes que inducen daño en el ADN. Las CP, al igual que las células mitrales, son neuronas con una gran tasa metabólica y una altísima actividad sináptica (Womack y Khodakhah, 2002; Swensen y Bean, 2003; Davie et al., 2008). Por lo tanto, la hipótesis planteada para las células mitrales pudiera ser también válida para las CP.

En condiciones fisiológicas el daño espontáneo en el ADN es reparado principalmente mediante recombinación homóloga o unión de extremos no homólogos (Melo y Toczyski, 2002; Shiloh, 2003a, b). En este proceso participan las proteínas γ-H2AX, la pATM o la 53BP1, entre otras (Fernández-Capetillo et al., 2004; Ijima et al., 2008; McKinnon, 2009). Cuando existe una lesión del ADN estas proteínas sufren ciertas modificaciones que conducen a la formación de focos de señalización en la región dañada. También se sabe que

ATM puede fosforilarse en el núcleo sin que existan daños en el ADN, sólo por cambios en la conformación de la cromatina (Bakkenist y Kastan, 2003). Sin embargo, en ausencia de daños en el ADN ATM nunca se localiza formando focos. Mediante hibridación de *microarrays* hemos comprobado que genes que transcriben proteínas que participan en estas vías de señalización/reparación del ADN se encuentran sobreexpresados (ver Resultados). Por lo tanto, ante la aparición de lesión en las CP del ratón PCD, los sistemas de señalización/reparación se activan. La activación de estos complejos proteicos se ha descrito también durante la degeneración de las células mitrales del ratón PCD (Valero et al., 2006), donde los complejos reparadores (pATM y 53BP1) se localizan en los mismos focos de rotura señalizados por la γ-H2AX (Valero et al., 2006). La respuesta al daño del ADN en las CP del ratón también se caracteriza por la activación de los componentes típicos de la vía de señalización de daño y reparación del ADN, tales como γ-H2AX, pATM y 53BP1. Sorprendentemente, en las CP del ratón PCD, aunque los sistemas de reparación/señalización están activados, éstos no se reclutan en los focos de rotura señalizados por la proteína γ-H2AX. Es decir, en las CP del ratón PCD existe una alteración en los mecanismos de reparación del ADN.

La formación y acumulación de focos nucleares de γ-H2AX en las CP del ratón PCD acompañado de la incapacidad de estas neuronas para elaborar una respuesta efectiva ante el daño que se produce en su ADN, deben ser causas que estén fuertemente implicadas en la rápida muerte que experimentan las CP del PCD. De hecho, muchas de las CP que exhiben focos positivos para γ-H2AX a P20, también son TUNEL+ y, por lo tanto, han entrado en apoptosis (aunque también, en menor medida, detectamos CP γ-H2AX+/TUNEL-). Ello sugiere que el daño en el ADN se relaciona de forma inmediata con la fragmentación apoptótica del mismo, incluso en etapas muy tempranas de la degeneración. En esta rápida transición desde la aparición e incremento de los focos de lesión del ADN a la detección de cuerpos apoptóticos, seguramente esté implicado el fallo en los sistemas de reparación del ADN. De hecho, se ha demostrado en otros procesos degenerativos que los focos de reparación grandes e intensamente teñidos se suelen asociar con lesiones del ADN irreparables (Petrini y Stracker, 2003). Todo esto indica que la gravedad de las lesiones en el ADN unido a los defectos observados en la vía de señalización/reparación del daño en el ADN acelera la degeneración de las CP del ratón PCD. Como comentamos antes, esto difiere del patrón de degeneración observado en las células mitrales (Valero et al., 2006). En el caso del BO, los focos de lesión observados son menores, probablemente debido a que las proteínas reparadoras ejercen su función localizándose en los focos de lesión señalizados por la γ-H2AX (Valero et al., 2006). Sin embargo, aunque de una forma mucho más lenta, las células mitrales del ratón PCD finalmente mueren por apoptosis (Valero et al., 2006). La aparición de focos de lesión en el ADN y el tipo de respuesta de los mecanismos de reparación no se han analizado aún en las neuronas talámicas y los fotorreceptores de la retina, los otros dos tipos neuronales afectados por la mutación pcd.

Existen cada vez más evidencias que relacionan la existencia de focos de rotura del ADN y fallos en los sistemas de reparación del ADN con la etiología de enfermedades humanas neurodegenerativas (Rolig y McKinnon, 2000; Brooks, 2002; Caldecott, 2004; McKinnon, 2004, 2009; Francisconi et al., 2005; Paulson y Miller, 2005). Se han descubierto distintos tipos de enfermedades dependiendo del tipo de mecanismo de reparación que ha fallado (McKinnon, 2009). Una de las más estudiadas es la *ataxia telangiectasia*, en la que se encuentra mutado el gen que codifica para la ATM (McKinnon, 2009). Los pacientes con ataxia telangiectasia tienen una extrema sensibilidad a la radiación ionizante y sufren una fuerte atrofia del cerebelo debido a la pérdida de CP y los granos. Existen otras enfermedades como el *desorden similar a la ataxia telangiectasia* y el *síndrome de Nijmegen* en los que los genes mutados codifican para proteínas del complejo MRN (Carney et al., 1998; Taylor et al., 2004). La ausencia, o un funcionamiento incorrecto, de estas proteínas desencadenaría la acumulación de roturas en el ADN pudiendo afectar a genes transcripcionalmente activos, que al inactivarse pueden incrementar la tasa de muerte de las neuronas (Brooks, 2002). Este proceso de silenciamiento génico parece que es el que está ocurriendo en las CP del ratón PCD.

Silenciamiento génico de las CP del ratón PCD

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis Doctoral señalan que durante la degeneración de las CP éstas sufren un proceso rápido y progresivo de heterocromatinización y silenciamiento génico. Hemos comprobado que la mutación pcd favorece la formación de numerosos agregados de la histona H4-K20-3Me, que se corresponden con dominios inactivos de cromatina en las CP (ver Introducción y Resultados). Varios trabajos proponen que la trimetilación de la histona H4 en su lisina 20 sirve como una marca epigenética de silenciamiento génico (Sarg et al., 2004; Schotta et al., 2004). La existencia de mecanismos epigenéticos de silenciamiento génico en las CP de los ratones PCD concuerda con a) la presencia de abundantes y prominentes masas de heterocromatina detectadas con el microscopio electrónico; b) el bloqueo de la exportación de los ARNm al citoplasma, que ya se ha detectado en otras enfermedades degenerativas como la distrofia muscular oculofaríngea (Calado et al., 2000); c) la represión transcripcional de numerosos genes que hemos detectado por hibridación de *microarrays*; y d) la desestructuración del RER. Las evidencias que señalan que la mutación del gen *nna1* conduce a una fuerte represión génica concuerdan con los trabajos de análisis de la tasa transcripcional de los genes del cerebelo del ratón mutante PCD^{3J}, que describen también una fuerte represión transcripcional (Xiao et al., 2005; Ford et al., 2008). Este proceso de represión génica es uno de los primeros signos pre-neurodegenerativos en las CP del ratón PCD, precediendo a la aparición de focos de lesión del ADN. En las etapas más avanzadas de la degeneración, los focos de rotura del ADN se localizan en la periferia de las grandes masas de heterocromatina. De hecho, este mecanismo de heterocromatinización puede ser una respuesta del sistema para que la mayor parte de la cromatina esté menos expuesta a un posible daño en el ADN. Estudios de nuestro grupo de investigación han demostrado que durante la muerte de las células

mitrales del ratón PCD, éstas sufren un proceso de silenciamiento génico previo a su muerte (Valero et al., 2006). Otro de los elementos afectados por la mutación pcd, las neuronas talámicas, sufren también un proceso progresivo de heterocromatinización en los estadios iniciales de la degeneración (O´Gorman, 1985). Por lo tanto, otro de los signos pre-neurodegenerativos que comparten las neuronas afectadas por la mutación pcd es la condensación de la cromatina.

Alteraciones del nucleolo

Concomitantemente a las modificaciones de la cromatina, la mutación pcd provoca la segregación de los componentes nucleolares de las CP (ver Resultados). Estas modificaciones estructurales que sufre el nucleolo se asocian normalmente con una disfunción grave de la transcripción nucleolar (Puvion-Dutilleul et al., 1992). De hecho, estas alteraciones se han detectado en líneas celulares de cultivo cuando se induce la inhibición de la transcripción nucleolar con actinomicina D (Fakan, 1986; Puvion-Dutilleul et al., 1992; Casafont et al., 2006) o con adriamicina en las neuronas de ganglios sensoriales (Pena et al., 2000). Además, la alteración en la biogénesis de los ribosomas está asociada a una desorganización del RER, una modificación que hemos descrito previamente en las CP del ratón PCD y que refleja la existencia de una maquinaria transcripcional deficiente. Como hemos demostrado, las CP del ratón PCD tiene grandes focos de lesión en el ADN. No hay que olvidar la presencia del ADNr en el nucleolo. Aunque no se ha investigado, seguramente el ADNr se encuentre fuertemente alterado en las CP del ratón PCD, lo que incrementaría la alteración nucleolar, como ya se ha descrito en otros modelos (Wang et al., 2006). Este proceso de segregación del nucleolo se ha observado también durante la degeneración de las neuronas talámicas y las células mitrales en el ratón mutante pcd (O´Gorman, 1985; Valero et al., 2006). El estudio de la posible alteración del ADNr en las CP del ratón PCD es una hipótesis interesante para futuras investigaciones.

Alteraciones del cuerpo de Cajal

Nuestros resultados demuestran que en las CP del ratón PCD existe una serie de alteraciones en los CC que ocurren desde las etapas pre-neurodegenerativas (ver Resultados). La secuencia de acontecimientos incluye hipertrofia de los CC, dejando de ser CC típicos, desintegración de los CC, y la traslocación de la coilina al nucleolo o bien alrededor de los nucleolos (ver Resultados). Los CC son compartimentos relacionados con el procesamiento de los ARN. La transcripción y el procesamiento del ARN son procesos altamente coordinados (Proudfoot et al., 2002), una reducción en la transcripción de pre-ARNm en la CP de los ratones PCD puede inducir una reorganización de la maquinaria de procesamiento del ARN. De esta manera, la reducción en el número de CC y la relocalización de la coilina en y alrededor del nucleolo ponen de manifiesto que los CC son orgánulos nucleares dependientes de transcripción y reflejan alteraciones del procesamiento de las RNPsn (Lafarga et al., 1998; Pena et al., 2001; Cioce y Lamond, 2005; Girard et al., 2006; Lemm et al., 2006;

Berciano et al., 2007; Morris, 2008). Estos datos concuerdan con los que hemos descrito en el apartado anterior sobre la represión transcripcional existente en las CP del ratón PCD. Las células mitrales del ratón PCD también presentan una reducción del número de CC durante las etapas iniciales de la degeneración, así como la reorganización de la coilina alrededor del nucleolo, aunque no se detectó su traslocación al mismo (Valero et al., 2006). Estas alteraciones se han detectado también en neuronas del ganglio del trigémino tras una lesion en nervios periféricos (Navascués et al., 2004b) o tras el tratamiento con leptomicina B (Carvalho et al., 1999).

Activación de la vía del proteasoma en las CP del ratón PCD

Hemos demostrado cómo durante la degeneración de las CP del ratón PCD la vía de degradación proteica del proteasoma se activa fuertemente, tanto en el núcleo como en el citoplasma (ver Resultados). Como consecuencia del metabolismo aeróbico se generan especies reactivas de oxígeno que producen modificaciones oxidativas en las proteínas. Durante los procesos que generan estrés oxidativo, la oxidación de proteínas se incrementa de forma significativa y puede comprometer la supervivencia de la neurona. El proteasoma reconoce de forma selectiva y degrada las proteínas oxidadas del citoplasma, el núcleo y el RER, minimizando así la citotoxicidad (Grune et al., 1995). En los casos donde se produce un gran incremento del estrés oxidativo, como el que ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas (como la esclerosis lateral amiotrófica), el grado de oxidación proteica es tal que se generan fragmentos o agregados de proteínas que comienzan a ser resistentes a la proteolisis (Urushitani et al., 2002). De hecho, estos agregados de proteínas oxidadas se pueden unir al proteasoma 20S y actuar como inhibidores irreversibles, acumulándose así las proteínas citotóxicas, tanto en el núcleo como en el citoplasma (Davies, 2001; Shringarpure et al., 2001). El alto grado de activación del proteasoma 20S en las CP del ratón mutante PCD sugiere la existencia de un nivel alto de estrés oxidativo en estas neuronas. Estos datos estarían en consonancia con la presencia de mayor S-nitrosilación de proteínas que hemos detectado en el vermis del cerebelo del ratón PCD. Este estudio también se realizó durante la degeneración de las células mitrales del BO del ratón PCD; sin embargo, el patrón de expresión de esta proteína no difería ostensiblemente del observado para los animales control (Dr. Valero; comunicación personal). Este dato sugeriría, de forma indirecta, que el grado de estrés oxidativo de las células mitrales durante su proceso de muerte pudiese ser menor que el que experimenta las CP. Este patrón de agregación del proteasoma 20S acompañado además de un estrés del RER se ha observado también durante el patrón degenerativo que ocurre en la ataxia espino-cerebelar (Seki et al., 2007).

Activación y función de la glía. Consecuencias en el ratón mutante PCD

Los primeros estudios acerca de la degeneración de las CP del PCD se centraron en analizar las alteraciones morfológicas que sufrían estas neuronas (Mullen et al., 1976; Landis

y Mullen, 1978). Estudios posteriores han centrados sus análisis en las vías moleculares que participan y desencadenan la muerte de las CP (Kyuhou et al., 2006). De hecho, dos estudios independientes han llevado a cabo un análisis de expresión diferencial de genes en el cerebelo del ratón PCD^{3J} (Xiao et al., 2005; Ford et al., 2008). Los trabajos más recientes van encaminados al análisis estructural y funcional del gen afectado en la mutación pcd, el gen *nna1* (Chakrabarti et al., 2006; Wang et al., 2006; Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007).

Se conoce que durante los procesos neurodegenerativos la glía (astrocitos y microglía) se activa y desencadena una respuesta; en principio esta activación tiene carácter neuroprotector, siendo la primera respuesta de defensa del sistema nervioso central. Sorprendentemente, en el cerebelo del ratón mutante PCD aún no se ha analizado la posible gliosis reactiva que pueda desencadenarse durante la muerte de las CP. Nuestros resultados evidencian que durante la degeneración de las CP del cerebelo del ratón mutante PCD, tanto la microglía como los astrocitos sufren una fuerte gliosis reactiva. Además, este trabajo es el primero que describe la afectación que sufren los oligodendrocitos del cerebelo del ratón PCD.

Activación de la microglía en el cerebelo del ratón PCD

Para definir la activación de la microglía se deben tener en cuenta varios aspectos: los cambios morfológicos que sufren estas células, entre los que se encuentran la hipertrofia y el engrosamiento y acortamiento de sus ramificaciones, además de diversas modificaciones que suceden en la expresión de ciertas proteínas (ver Resultados; Kim y de Vellis, 2005; Garden y Möller, 2006; Biber et al., 2007). Los análisis histológicos y citológicos permitieron observar que en el cerebelo del ratón PCD la microglía adquiría la morfología típica de microglía reactiva (ver Resultados). Además, analizamos mediante hibridación de *microarrays* distintos tipos de señalización que desencadenan la gliosis, así como la respuesta biológica de la microglía reactiva.

Muchos factores participan en la activación de la microglía (Garden y Möller, 2006). Esta activación está mediada, entre otros, por los receptores P2X que participan además en la secreción de factores pro-inflamatorios (Brautigam et al., 2005; Davalos et al., 2005). El análisis mediante hibridación de *microarrays* mostraba un fuerte incremento de genes que codifican para estos receptores en el vermis del ratón PCD (Tabla 14).

La activación de la microglía inducida por lipopolisacáridos está mediada por los receptores TLR (del inglés: *Toll-Like Receptors*), y desencadena la liberación de citocinas o quimiocinas (Takeda et al., 2002). Esta activación produce la sobreexpresión de los genes Myd88, ERK (del inglés: *Extracellular signal-Regulated Kinase*), JNK (del inglés: *c-Jun N-terminal Kinase*) o p38 MAP quinasa, que a su vez activan al factor de transcripción factor Nf-κB (del inglés: *nuclear factor-κB*) promoviendo así la respuesta inflamatoria (Takeda et al., 2002; Milligan y Watkins, 2009). Nuestros resultados demostraron que existía una sobreexpresión de este conjunto de genes en el cerebelo del ratón PCD (Tabla 14).

Una vez activada, la microglía ejerce su función biológica que incluye: la secreción de factores difusibles, la migración, la fagocitosis, la presentación antigénica o la producción de óxido nítrico (Garden y Möller, 2006).

Entre el amplio espectro de factores pro-inflamatorios secretados por la microglía reactiva se encuentran las citocinas (interleucinas, interferones, o el factor de necrosis tumoral), quimiocinas, factores tróficos o pequeñas moléculas lipídicas (Minguetti y Levi, 1998; Honda et al., 1999; Hanisch, 2002; Kim y de Vellis, 2005). El análisis por hibridación de *microarrays* demostró que genes implicados en la síntesis de muchos de estos factores aparecían sobreexpresados en el cerebelo del ratón PCD (Tabla 14).

La microglía reactiva tiene la capacidad de migrar hasta la zona donde se ha producido el daño. La doble inmunohistoquímica para Iba1 y CB mostraba cómo las células de microglía activada se situaban en la zona donde se localizaban las CP en proceso degenerativo (Fig. 34). Este proceso parece estar mediado por moléculas quimioatrayentes, principalmente de la familia de las quimiocinas. Además, moléculas como la β2 integrina o factores de crecimiento endotelial se requieren también para la migración correcta de estas células (Ullrich et al., 2001; Forstreuter et al., 2002). Nuestros resultados demuestran la sobreactivación de genes que codifican algunos tipos de quimiocinas, receptores de quimiocinas, factores de crecimiento endotelial e incluso la β2 integrina en el cerebelo del ratón PCD (Tabla 14).

La principal función de la microglía reactiva es la fagocitosis; permite retirar las neuronas afectadas o los restos de éstas en casos de daño del sistema nervioso. Para la interacción microglía reactiva-neurona dañada es necesaria la participación del receptor CD36 y los receptores "orphan" (Stolzing y Grune, 2004; Garden y Möller, 2006) cuya expresión se encuentra aumentada en el cerebelo del ratón PCD (Tabla 14). Otro proceso en el que participa la microglía reactiva es la presentación antigénica, en la que actúan múltiples receptores (Reichmann et al., 2002). Nuestros resultados demuestran que muchos de los genes encargados de sintetizar algunos de los receptores que participan en la presentación antigénica presentaban una mayor tasa transcripcional en el cerebelo del ratón PCD comparada con la del control (Tabla 14).

Otra de las consecuencias de la gliosis es la síntesis de óxido nítrico; reacción en este caso catalizada por la iNOS (Garden y Möller, 2006). Estudios previos han demostrado que en el cerebelo del ratón mutante PCD existe una sobreactivación de este enzima sugiriendo, por lo tanto, un incremento en la síntesis de óxido nítrico (Kyuhou et al., 2006). Esto último estaría en consonancia con el aumento de expresión del enzima guanilato ciclasa, puesto que este enzima es diana directa del óxido nítrico. En resumen, este es el primer trabajo en el que se describe el patrón temporal de activación de la microglía durante el proceso degenerativo de las CP en el ratón mutante PCD.

Activación de la astroglía en el cerebelo del ratón PCD

En condiciones normales, los astrocitos participan en muchos procesos biológicos como la transmisión glutamatérgica, el metabolismo energético y el control del flujo sanguíneo, entre otros (Ransom et al., 2003). Más recientemente se ha descrito su participación en la plasticidad sináptica (Halassa et al., 2007) y en la transmisión nerviosa (Araque, 2006). En condiciones patológicas, los astrocitos se activan y llevan a cabo funciones neuroprotectoras, compaginando la función de la microglía activada (Pekny y Nilsson, 2005; Correa-Cerro y Mandell, 2007; Escartin y Bonvento, 2008). Las moléculas pro-inflamatorias liberadas desde la microglía reactiva tienen la capacidad de activar a los astrocitos, amplificando así la respuesta inflamatoria (van Rossum y Hanisch, 2004). No existen evidencias de la respuesta de los astrocitos ante la muerte de las CP como consecuencia de la ausencia del gen *nna1*. Nuestros resultados obtenidos mediante técnicas histológicas y de hibridación de *microarrays* apoyan la existencia una astrogliosis progresiva en el cerebelo del ratón PCD, que es pareja a la activación de la microglía (ver Resultados).

Hay que resaltar la activación rápida y temprana de estos elementos gliales en el cerebelo del ratón PCD. Nuestros resultados demuestran que a P15 ya se detecta activación de ambos elementos. A esta edad, las únicas alteraciones que habíamos detectado en algunas CP eran la desestruturación del RER, la reducción de los CC y la alteración axonal y dendrítica, mientras que el resto de la citología parecía inalterada. Por lo tanto, a P15 tanto los astrocitos como la microglía deben de responder a alguna señal, liberada o expuesta por las CP que desencadene su activación. El proceso degenerativo de las CP debe entonces comenzar antes de lo que se ha descrito en trabajos anteriores (Landis y Mullen, 1978). Esto estaría en consonancia con el *test* del Rota-rod, que demuestra que los ratones PCD poseen una menor habilididad motora que los animales control ya a P15 (ver Resultados).

Estado de la oligodendroglía en el cerebelo del ratón PCD

Este es el primer trabajo en el que se describe la muerte por apoptosis de los oligodendrocitos en el cerebelo del ratón PCD. Debido a la mutación pcd, los oligodendrocitos de la corteza cerebelosa mueren por apoptosis, directa o indirectamente. Varias pueden ser las causas que expliquen esta situación. Cuando existe una respuesta glial exacerbada ante un daño y se generan citocinas en exceso, peroxinitritos y sustancias reactivas de oxígeno, una de las consecuencias es la muerte por apoptosis de los oligodendrocitos, en concreto de precursores de oligodendrocitos mayoritariamente (Curatolo et al., 1997; Hisahara et al., 1997; Li et al., 2005, 2008; Miller et al., 2007; McTigue y Tripathi, 2008). Además de la implicación de la glía reactiva en la muerte de los oligodendrocitos, se pueden plantear otras hipótesis que expliquen la muerte por apoptosis de los oligodendrocitos en el cerebelo del ratón mutante PCD. La primera es que los oligodendrocitos expresen Nna1 de forma normal y que ante su ausencia éstos mueran. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* han descrito que en el cerebelo del ratón PCD el ARNm del gen *nna1* sólo se expresa en los granos y en las CP (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002). Los oligodendro-

citos tienen como función principal formar la vaina de mielina de los axones, y se ha demostrado su afectación en enfermedades neurodegenerativas que dañan a los axones como la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington o la enfermedad de Alzheimer (Roth et al., 2005; Bartzokis et al., 2007; Korn, 2008). En este estudio hemos comprobado que existe una fuerte alteración en los axones de las CP del ratón PCD ya desde estadios preneurodegenerativos. La muerte de los oligodendrocitos puede depender también de la pérdida del factor trófico que el axón de la CP representa para estos elementos gliales. Una combinación de todos estos factores posiblemente desencadene la muerte de este elemento neural.

¿La gliosis reactiva acelera la degeneración de las células de Purkinje?

Como ya hemos descrito, la activación glial es una señal de alteración en el sistema nervioso (van Rossum y Hanisch, 2004; Kim y de Vellis, 2005; Garden y Möller, 2006; Escartin y Bonvento, 2008). En condiciones de neurodegeneración, para conferir neuroprotección a las neuronas no dañadas, la glía reactiva desencadena una reacción inflamatoria a través de la liberación de moléculas pro-inflamatorias, además de desarrollar su maquinaria fagocítica (Garden y Möller, 2006; Escartin y Bonvento, 2008). Sin embargo, en algunos casos la respuesta de la glía puede ser excesiva e incontrolada, siendo más perjudicial que beneficiosa para el sistema (Wyss-Coray y Mucke, 2002). No se conocen con exactitud las causas que provocan una respuesta incontrolada de la glía activada y que, por lo tanto, produzca neurotoxicidad en la región ya dañada. De hecho, aún existe controversia sobre los efectos neuroprotectores o neurotóxicos de la glía reactiva (Tacconi, 1998; Wyss-Coray y Mucke, 2002; van Rossum y Hanisch, 2004; Pekny y Nilsson, 2005; Garden y Möller, 2006). Es decir, en condiciones patológicas la glía reactiva puede desarrollar respuestas antagónicas (Wyss-Coray y Mucke, 2002; Pekny y Nilsson, 2005). Dependiendo de la intensidad de la gliosis se han descrito dos tipos de estados inflamatorios (Milligan y Watkins, 2009). El **estado pro-inflamatorio** refleja una activación desmesurada de la glía que como consecuencia produce un entorno neurotóxico en la región ya dañada (Milligan y Watkins, 2009). En cambio, en el **estado anti-inflamatorio** la glía responde de forma proporcional al daño que existe en la región afectada, confiriendo neuroprotección a las células no afectadas, liberando sustancias que previenen su propia acción neurotóxica (Milligan y Watkins, 2009). Se ha propuesto que el efecto adverso de la glía reactiva durante la respuesta inflamatoria es causado por una descompensación entre las señales pro- y anti-inflamatorias (Milligan y Watkins, 2009). De hecho, la glía reactiva libera distintos tipos de citocinas y quimiocinas dependiendo del estado inflamatorio (Milligan y Watkins, 2009). Tanto la interleucina 1 como la interleucina 6 son citocinas preferentemente liberadas en el estado pro-inflamatorio, promoviendo así un estado aún más pro-inflamatorio, mientras que la interleucina 4 se libera principalmente en el estado anti-inflamatorio (Biber et al., 2007; Milligan y Watkins, 2009). La sobreactivación de la ruta de las MAP quinasas (que activan

aguas abajo al factor NF-κB), o la presencia de la proteína MMP-9 (del inglés: *matrix metalloproteinase-9*) ocurren también en el estado pro-inflamatorio (Milligan y Watkins, 2009). Otra sustancia liberada en el estado pro-inflamatorio es el óxido nítrico (Garden y Möller, 2006; Milligan y Watkins, 2009). La producción excesiva de óxido nítrico induce la S-nitrosilación de proteínas, la activación de la MMP-9 (Sternlicht y Werb, 2001; Gu et al., 2002) y la alteración de la señalización por GMPc (Marcoli et al., 2006). Más aún, la sobreproducción de óxido nítrico incrementa la actividad del enzima superóxido dismutasa, que amplifica la neurotoxicidad cuando la glía está activada (Boje y Arora, 1992; Yamanaka et al., 2008). En el cerebelo del ratón PCD existe una sobreexpresión del enzima iNOS durante el periodo degenerativo de las CP (Kyuhou et al., 2006). Además, nuestros estudios de *western-blot*, hibridación de *microarrays* e inmunohistoquímica han demostrado una mayor nitrosilación de proteínas en el cerebelo del PCD, la sobreexpresión de genes que participan en la ruta de las MAP quinasas, de la MMP-9, de la superóxido dismutasa y de la isoforma soluble del enzima guanilato ciclasa (enzima que sintetiza la GMPc). Todos estos datos sugieren que en la CP del ratón PCD debe de existir un gran estrés oxidativo y que en el cerebelo, durante la respuesta de la microglía, parece existir un estado pro-inflamatorio. Estos datos concordarían con los resultados anteriormente descritos acerca del patrón de expresión del proteasoma 20S en la CP del ratón PCD y su relación con un entorno de estrés oxidativo.

Otro hecho que muestra que la respuesta glial en el cerebelo del ratón PCD es desmesurada es el patrón de expresión que muestran los astrocitos reactivos. Cuando el daño neuronal es reducido, estas células reacccionan según una **astrogliosis isomórfica**, que se caracteriza por una distribución homogénea de éstos en la región afectada, y por una orientación aleatoria de sus ramificaciones (Kalman, 2004). Por el contrario, cuando la lesión es más importante tiene lugar la **astrogliosis anisomórfica**, donde los astrocitos delimitan claramente la zona dañada con sus procesos dirigiéndose hacia los elementos neuronales afectados (Kalman, 2004), existiendo además una gran producción de óxido nítrico, incluso mayor que la de la microglía reactiva. La gliosis isomórfica es un proceso reversible, mientras que la anisomórfica perdura mucho más en el tiempo (Kalman, 2004). Nuestros resultados muestran que los astrocitos reactivos adquieren una configuración que pudiera considerarse anisomórfica, donde se delimita perfectamente la zona dañada, situándose en la CCP (al igual que la microglía reactiva) con sus prolongaciones rodeando el soma de las CP y en la superficie de la CM, es decir, parecen delimitar la zona ocupada por el soma y las dendritas de las CP.

Como ya hemos mencionado, se ha descrito que las CP del ratón PCD mueren por un proceso de apoptosis (Kyuhou et al., 2006; ver Resultados). Las características ultraestructurales que definen a una célula apoptótica son la condensación de la cromatina, la vacuolización citoplasmática y la preservación de las membranas celulares y los orgánulos (Krysko et al., 2006). Sin embargo, nuestro estudio revela que en el ratón PCD existen CP que exhiben características de células necróticas, como la rotura de las membranas celulares, la

desaparición de los orgánulos y la hinchazón del citoplasma (ver Resultados). Por lo tanto, nuestros resultados evidencian que la muerte de las CP del ratón PCD está mediada por dos procesos bien diferenciados, la necrosis y la apoptosis. Estas CP necróticas estaban normalmente englobadas por células de microglía reactiva. Si el proceso necrótico es consecuencia del entorno pro-inflamatorio existente o bien es consecuencia directa de la mutación del gen *nna1* aún lo desconocemos. La activación glial excesiva puede desencadenar la muerte neuronal tanto por apoptosis como por necrosis (Escobedo et al., 1998; Vicente et al., 2006; McKinnon, 2009). Planteamos la posibilidad de que la muerte de las CP que siguen la vía apoptótica pueda ser consecuencia directa de la mutación pcd e incluso de la actividad de la glía reactiva, mientras que aquéllas que mueren por necrosis pudieran hacerlo como consecuencia del entorno pro-inflamatorio que se genera por la activación glial exacerbada. Existen, sin embargo, ocasiones en las que células que comienzan a morir por un mecanismo apoptótico sufren un proceso de necrosis secundaria, adquiriendo la morfología de una célula necrótica y que son reconocidas por células de microglía activada (Krysko et al., 2006). Por lo tanto, no debemos descartar la posibilidad de que todas las CP comiencen a morir por un proceso apoptótico originado por la ausencia de la proteína Nna1 y que algunas de ellas experimenten un proceso de necrosis secundaria, y sean éstas últimas las que observamos a microscopía electrónica. Estudios posteriores deberán responder a esta cuestión.

Como ya hemos descrito, cuando la respuesta glial es desmesurada los precursores de oligodendrocitos pueden sufrir muerte celular por apoptosis (Curatolo et al., 1997; Hisahara et al., 1997; Li et al., 2005, 2008; Miller et al., 2007; McTigue y Tripathi, 2008). Nuestros resultados demuestran la muerte por apoptosis de oligodendrocitos. Por lo tanto, estos datos apoyan la existencia de un entorno pro-inflamatorio en el cerebelo del ratón PCD.

En resumen, todos estos datos sugieren que en el cerebelo del ratón mutante PCD la microglía y los astrocitos se activan de forma incontrolada, liberando factores que generan un estado pro-inflamatorio que parece ser neurotóxico en vez de neuroprotector para las CP del ratón PCD. Este efecto adverso de la glía reactiva probablemente esté relacionado con la rápida degeneración que sufren las CP del ratón mutante PCD. Es decir, nuestros resultados sugieren que la muerte de las CP del ratón PCD a causa de la mutación del gen *nna1* induce la activación de la astroglía y la microglía, que a su vez produce neurotoxicidad aumentando la tasa de muerte de las CP.

Activación de la glía en el bulbo olfatorio

En el presente trabajo de Tesis Doctoral decidimos analizar también si existía un proceso de gliosis durante la degeneración de las células mitrales. El proceso degenerativo de las células mitrales del BO del ratón PCD comienza más tarde y es más lento que el de las CP (Greer y Shepherd, 1982; Fernández-González et al., 2002; Valero et al., 2006). Las causas por las que los tipos neuronales afectados por la mutación pcd (CP, células mitrales, neuronas talámicas y fotorreceptores de la retina) degeneran a distintas edades, y con un

patrón temporal tan diverso aún se desconocen. Basándonos en la hipótesis que planteamos en el apartado anterior sobre la implicación de la glía reactiva en la aceleración de la muerte de las CP, decidimos analizar la respuesta glial durante el periodo degenerativo de las células mitrales del ratón PCD, y estudiar si este proceso pudiera influir en mayor o menor medida en la muerte de estas neuronas. Este proceso no había sido estudiado en el BO.

Nuestros resultados demuestran que durante el periodo degenerativo de las células mitrales, la microglía residente se activa (ver Resultados). Estas células sufren cambios morfológicos típicos de la gliosis, se hipertrofian y las ramificaciones se acortan y se engrosan (ver Resultados). Sin embargo, estos cambios morfológicos son menos drásticos que los detectados en el cerebelo durante la degeneración de las CP. Además, a diferencia de lo que ocurre en el cerebelo, la microglía reactiva del BO se distribuye de forma homogénea por todas las capas bulbares, y no hemos observado que las células de microglía ocupen el espacio dejado por las células mitrales en la capa de las células mitrales (CCM), a diferencia de la monocapa que constituían en la CCP del cerebelo. Además, los estudios ultraestructurales realizados durante la degeneración de las células mitrales sólo detectaban de forma muy esporádica células de microglía reactiva englobando a células mitrales (comunicación personal Dr. Valero, Universidad Autónoma de Barcelona). Estos datos parecen reflejar que durante la degeneración de las células mitrales la activación de la microglía es menor que la que ocurre en el cerebelo durante la muerte de las CP.

Los astrocitos, al igual que la microglía, también se activan aumentando su número en el BO del ratón PCD. El patrón de expresión de los astrocitos es similar al observado para la microglía reactiva, es decir, se distribuyen de forma homogénea por todas las capas bulbares, y a diferencia de lo que ocurre en el cerebelo, en este caso los astrocitos reactivos no delimitan la zona dañada. Por lo tanto, esta respuesta astroglial tiene las características de un **astrogliosis isomórfica** (Kalman, 2004) reflejando entonces una respuesta más mesurada que la que ocurre en el cerebelo del ratón PCD durante la degeneración de las CP.

Respecto al tercer elemento glial, la población de oligodendrocitos parece no estar afectada en los periodos de tiempo analizados. De hecho, no encontramos oligodendrocitos que fueran TUNEL+ en el BO. Puesto que la activación de la microglía y los astrocitos en el BO del PCD es mucho menor que la observada en el cerebelo, sugerimos que tanto la liberación de moléculas pro-inflamatorias como la producción de óxido nítrico, en caso de existir, debe ser menor. Esto podría explicar en parte que los oligodendrocitos del BO parezcan no estar afectados por el entorno inflamatorio generado por la degeneración de las células mitrales, a diferencia del entorno claramente pro-inflamatorio que hemos encontrado en el cerebelo.

A pesar de que estudios previos habían descrito que las CP del ratón mutante PCD mueren por un proceso de apoptosis (Kyuhou et al., 2006), en este trabajo de Tesis Doctoral hemos demostrado que la degeneración de las CP puede estar mediada por un proceso

apoptótico o bien por un proceso necrótico (ver Resultados). Los estudios ultraestructurales realizados en el BO demuestran que su muerte está mediada mayoritariamente por un mecanismo apoptótico; y no se detectaron apenas células mitrales en degeneración por necrosis (Valero et al., 2006). Hay que señalar que durante la degeneración de las células mitrales, la activación de la glía (microglía y astrocitos) ocurre en un periodo muy temprano (respecto al patrón temporal de muerte de las células mitrales), ya que a P50 detectamos la activación glial. Es decir, al menos desde P50, en el BO existen señales de activación, probablemente liberadas por las células mitrales, que inducen la gliosis. Sin embargo, a medida que avanza el grado neurodegenerativo de las células mitrales, la respuesta inflamatoria de la glía reactiva parece no incrementarse, y en todo momento es mucho menor que la observada en el cerebelo.

Resumiendo, lo que proponemos es que durante la degeneración de las células mitrales del BO del ratón PCD existe una activación glial. En todo caso, esta activación es menor que la detectada en el cerebelo durante la muerte de las CP. El hecho de que ni los astrocitos ni la microglía sufran grandes cambios morfológicos y no delimiten la región dañada, que los oligodendrocitos bulbares no degeneren y que no aparezcan células necróticas parece indicar que la respuesta glial es, en este caso, neuroprotectora. Por todo ello, proponemos que la degeneración de las células mitrales tiene lugar durante una ventana de tiempo más amplia que el proceso que ocurre en el cerebelo del ratón PCD.

La edad y el tiempo durante el que transcurre la degeneración de las neuronas talámicas es muy similar a lo que sucede con las células mitrales (O´Gorman, 1985). Durante la degeneración de las neuronas talámicas se ha descrito la presencia de cuerpos apoptóticos, y en ningún momento se ha observado un proceso necrótico de estas neuronas en el ratón PCD. De forma muy escueta, se ha descrito la hipertrofia de los astrocitos en la zona donde degeneran las neuronas talámicas (O´Gorman, 1985), aunque no se conoce el comportamiento de la microglía en el tálamo durante la muerte de estas neuronas. Un análisis más profundo de la respuesta glíal en esta región durante la degeneración de las neuronas talámicas del ratón PCD aportaría más información del tipo de respuesta glial durante la degeneración de distintos tipos neuronales. La degeneración de los fotorreceptores de la retina del ratón mutante PCD es muy lenta, ocurre en un periodo muy largo de tiempo, aunque comienza a edades muy similares al proceso de las CP (Blanks et al., 1982; LaVail et al., 1982). De hecho, al año de vida todavía queda un alto porcentaje de fotorreceptores (LaVail et al., 1982). Hay evidencias que muestran que durante la degeneración de los fotorreceptores del ratón PCD existe una pequeña activación de la microglía y los astrocitos, en todo caso menor que la del cerebelo (Marchena, 2008). Este dato apoyaría nuestra hipótesis acerca de la alta implicación de la glía reactiva durante el proceso neurodegenerativo en el ratón mutante PCD.

¿Influye la gliosis en los patrones temporales de muerte neuronal del ratón PCD?

Ningún estudio anterior ha planteado las causas que provocan que la muerte de los cuatro tipos neuronales afectados por la mutación pcd ocurra en periodos de tiempo diferentes y específicos. En primer lugar mueren las CP, esta degeneración es muy rápida y ocurre entre la tercera y la cuarta semana de edad posnatal (Landis y Mullen, 1978). A continuación, alrededor de los 50 días de edad posnatal, comienzan a degenerar las neuronas talámicas (O'Gorman y Sidman, 1985). Por último, la degeneración de las células mitrales comienza a los dos meses de edad mientras que la de los fotorreceptores, aunque comienza a edades similares a las de las CP, se alarga mucho más en el tiempo (Mullen y LaVail, 1975; Blanks et al., 1982; LaVail et al., 1982).

Puesto que las CP y las células mitrales comparten la expresión de la proteína Nna1, analizamos el nivel transcripcional del gen *nna1* en el cerebelo y el BO de animales control desde P10 hasta P80 (periodos de tiempo que abarcan la degeneración de las CP y las células mitrales) mediante RT-PCR. Este es el primer estudio que analiza la expresión del gen *nna1* en el cerebelo y el BO a lo largo del tiempo. Nuestros resultados han demostrado que en el cerebelo del ratón control existe un incremento significativo en la transcripción del gen *nna1* entre P15 y P25. Además, hemos demostrado que en esta ventana de tiempo se expresan, al menos, dos de los tres transcritos codificados por el gen *nna1* en el cerebelo. Por el contrario, en el BO el nivel de expresión se mantiene constante en todos los periodos analizados. Es decir, en el cerebelo del ratón existe una gran síntesis del ARNm que presumiblemente traduce para la proteína Nna1 entre P15 y P25. Estos datos están en consonancia con el periodo degenerativo que tienen las CP en el ratón PCD. La proteína Nna1 entre P15 y P25 parece ser muy necesaria en el cerebelo y su ausencia, como podemos comprobar en el ratón mutante PCD, desencadena la muerte de las CP. Hay que señalar que en el cerebelo, en condiciones normales, los granos también expresan el ARNm codificado a partir del gen *nna1* (Fernández-González et al., 2002). Sin embargo, la degeneración de los granos del cerebelo del ratón PCD es secundaria a la pérdida de las CP (Ghetti et al., 1978; Triarhou et al., 1985). Puede ser que el pico de expresión que observamos entre P15 y P25 es sólo debido al aumento transcripcional del gen *nna1* en las CP. Asimismo, puede ocurrir que este incremento tenga lugar también en los granos, pero que la función de la proteína Nna1 sea vital en las CP mientras que los granos puedan de alguna manera compensar su falta. Estudios posteriores deberán aclarar este punto.

Sin embargo, en el BO la transcripción del gen *nna1* entre P10 y P80 es homogénea, no sufre variaciones a lo largo de las edades analizadas P10 y P80 (ver Resultados). Estos datos podrían explicar la respuesta diferencial de la glía que observamos entre el cerebelo y el BO durante la degeneración de las CP y las células mitrales, respectivamente. En el ratón PCD, ante la ausencia de esta proteína ocurre una respuesta inflamatoria mediada por la glía que, ante la magnitud del daño, se activa de forma exacerbada y en vez de conferir neuroprotección crea un entorno neurotóxico, afectando a las CP e incluso a los oligodendrocitos. Por el contrario, en el BO existe una expresión del transcrito del gen *nna1* basal menor que la

del cerebelo. Su ausencia provoca un daño en las células mitrales y una activación de la glía. Sin embargo, esta activación difiere de la registrada en el cerebelo del PCD y, probablemente, confiera un entorno neuroprotector en el BO sin afectar a las células mitrales ni los oligodendrocitos.

Proponemos que la suma de todos estos factores pueda ser una de las causas por la que difieran los periodos de tiempo y el tipo de degeneración en los que ocurre la muerte de las CP y las células mitrales del ratón mutante PCD. No debemos olvidar que otro de los factores (discutido anteriormente) que tiene que influir en que la degeneración de las CP sea más rápida que la de las células mitrales, es que los sistemas de reparación del ADN funcionen inicialmente en las células mitrales mientras que no lo hacen en las CP. Las razones por las que tiene lugar este hecho, y si la respuesta glial tiene algo que ver con ello, deberá dilucidarse en trabajos próximos.

Funciones de la proteína Nna1 en la modificación postraduccional de la α-tubulina

La proteína Nna1 es una metalocarboxipeptidasa

Las primeras evidencias acerca de la función del gen *nna1* se describieron en experimentos de regeneración neuronal y axonal tras axotomía (Harris et al., 2000). En este estudio se identificó un transcrito de 4 kb cuya expresión, tanto citoplasmática como nuclear, se incrementaba rápidamente de forma muy significativa en las motoneuronas tras el seccionamiento del nervio ciático (Harris et al., 2000). Una vez finalizado el proceso de reinervación tras la axotomía, la expresión de este transcrito disminuía y, si se inhibía la reinervación, la expresión se mantenía (Harris et al., 2000). Estudios mediante hibridación *in situ* demostraron que los transcritos de *nna1* estaban presentes en células diferenciadas y ausentes en zonas proliferativas (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002). Todos estos resultados indicaban que la proteína Nna1 debía de estar asociada a procesos de diferenciación y regeneración neuronal (Harris et al., 2000). Debido a su localización y a la función que parecía desempeñar, el gen se denominó *nna1* (del inglés: ***n****ervous system* ***n****uclear protein induced by* ***a****xotomy* ***1***).

El primer análisis estructural de este transcrito mostraba que estaba constituido por 1.228 aminoácidos y que poseía un dominio de unión a ATP/GTP y un dominio catalítico zinc-carboxipeptidasa, siendo por lo tanto una metalocarboxipeptidasa perteneciente a la familia de metalocarboxipeptidasas M14 (Harris et al., 2000). Estudios posteriores han confirmado la presencia de, al menos, tres transcritos distintos codificados a partir del gen *nna1* (Wang y Morgan, 2007). Además, se ha descrito que en el ratón existen otras 5 proteínas de esta subfamilia que presentan una alta homología con Nna1 (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Estudios filogenéticos más recientes han propuesto que debido a sus características estructurales, la proteína Nna1 y sus homólogas deben ser incluidas en una subfamilia específica de metalocarboxipeptidasas, en concreto en la subfamilia

M14D (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Se ha demostrado que la función correcta del dominio zinc-carboxipeptidasa es esencial para la supervivencia de determinadas neuronas, puesto que previene la degeneración de las CP y de los fotorreceptores de la retina en el ratón mutante PCD (Wang et al., 2006; Chakrabarti et al., 2008). En resumen, la proteína Nna1 tiene una actividad carboxipeptidasa, que participa durante la regeneración axonal y cuyo funcionamiento es imprescindible para la neurona.

¿Es la tubulina carboxipeptidasa la proteína codificada por el gen *nna1* y la α-tubulina su sustrato?

Desde el descubrimiento del gen *nna1* y la caracterización de la proteína Nna1 como metalocarboxipeptidasa la cuestión que se ha planteado y que no ha tenido respuesta aún es la siguiente: ¿Cuál es el la función exacta de Nna1 y cuál es el sustrato natural del enzima Nna1?

Los análisis estructurales de los sitios activos de la proteína Nna1 sugerían que el enzima Nna1 debería participar en la escisión de aminoácidos hidrófilos de proteínas citosólicas (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Estudios de predicción han propuesto que la única proteína citosólica conocida que podría ser susceptible de escisión de aminoácidos (concretamente hidrófilos) en el extremo C-terminal por la proteína Nna1 era la subunidad α de la tubulina (Kalinina et al., 2007). Esta proteína estructura los microtúbulos del citoesqueleto formando dímeros con la β-tubulina. Este dímero puede sufrir distintas modificaciones postraducionales (ver Introducción) que afectan al extremo C-terminal (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987).

Una de estas modificaciones que puede sufrir la α-tubulina es el ciclo de tirosinación/destirosinación (Fig. 48; Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987; Westermann y Weber, 2003). Inicialmente, la proteína sintetizada posee un resto de tirosina en su extremo C-terminal y se conoce como la forma tirosinada de la α-tubulina (Tyr-Tub). Este aminoácido puede escindirse gracias a una reacción catalizada por la tubulina carboxipeptidasa (tubCP), formándose la forma destirosinada de la α-tubulina (Glu-Tub), y reañadirse (tirosinarse) por la una reacción catalizada por la tubulina tirosina ligasa (TTL). Además, existe una tercera variante de α-tubulina que no puede ser tirosinada que se forma por la escisión del aminoácido Glu del extremo C-terminal y que se denomina Δ-Tub (Paturle-Lafanechère et al., 1989). Se ha propuesto que el enzima tubCP pudiera catalizar también esta reacción (Paturle-Lafanechère et al., 1989, 1994). Aunque la TTL ha sido identificada (Erck et al., 2005), la tubCP aún no ha sido caracterizada desde que fue descrita su función (Hallak et al., 1977; Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987). El estado tirosinado de la α–tubulina (Tyr-Tub) se ha asociado a microtúbulos dinámicos, por ejemplo, de células proliferativas (Gundersen y Bulinski, 1986), mientras que las formas destirosinada (Glu-Tub) y la no tirosinable (Δ-Tub) se encuentran asociadas a poblaciones de microtúbulos estables, como los presentes en neuronas maduras (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987). Trabajos recientes han propuesto que la proteína Nna1 pudiera ser el enzima tubCP (Kalinina et al., 2007; Rodrí-

guez de la Vega et al., 2007). A continuación analizaremos las evidencias que existen a favor y en contra de esta hipótesis.

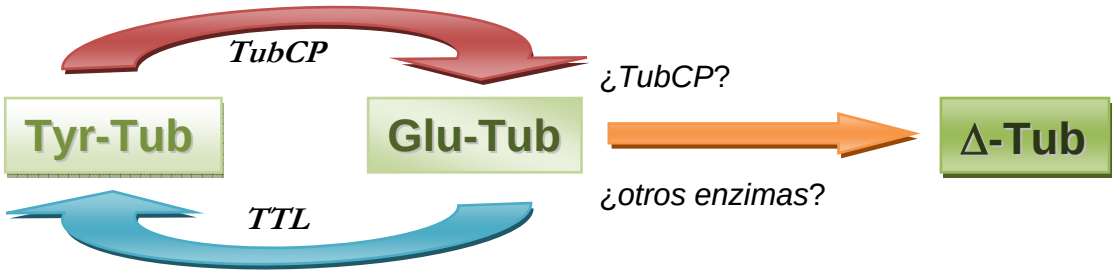

Figura 48. Esquema del ciclo de tirosinación/destirosinación de la α-tubulina. Durante la estabilización de los microtúbulos la α-tubulina sufre una modificación postraduccional que consiste en la escisión de un resto de tirosina del extremo carboxi-terminal. Esta reacción es catalizada por la tubulina carboxipeptidasa (tubCP). Esta reacción es reversible, pudiéndose añadir de nuevo el resto de tirosina gracias a la tubulina tirosina ligasa (TTL). Sin embargo, se puede escindir el resto de ácido glutámico de la Glu-tub formándose así la Δ-Tub. Aunque se ha propuesto que esta reacción puede estar catalizada por la tubCP (Paturle-Lafanechère et al., 1989), aún se desconoce cual es el enzima responsable de esta reacción.

Evidencias a favor

La hipótesis que plantea la proteína Nna1 como tubCP se basa en las siguientes observaciones: primero, los modelos informáticos basados en los sitios de unión del sustrato y en la estructura del sitio activo del enzima muestran de forma teórica la alta capacidad de la proteína Nna1 de eliminar residuos de tirosina del extremo C-terminal de la α-tubulina (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Segundo, proteínas con homología alta con Nna1 tienen una actividad enzimática sobre grupos hidrófilos situados en el extremo C-terminal, entre los que se encuentra la tirosina (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Tercera, la proteína Nna1 tiene una alta dependencia energética de los nucleótidos (ADP/ATP) que es congruente con la energía necesaria durante la transformación del extremo carboxi-terminal de la α-tubulina en la estabilización de los microtúbulos (Argarana et al., 1978). Cuarto, algunos datos moleculares que se han descrito previamente para la tubCP y que además difieren de los descritos para otras metalocarboxipeptidasas (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007) coinciden con las características teóricas propuestas para Nna1. [1]

Además de las semejanzas funcionales existentes entre Nna1 y la tubCP, existen otras evidencias que apoyan la hipótesis de que Nna1 sea la tubCP. Por ejemplo, el nivel de ARNm codificado a partir del gen *nna1* se incrementa tras una axotomía (Harris et al.,

[1] Por ejemplo, altas concentraciones de sal inhiben la actividad de la tubCP como ocurre en la proteína homóloga de Nna1 en *E.coli* (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Además, los dipeptidos Z-Glu-Tyr y Z-Gly-Tyr tienen una similar capacidad inhibitoria en la actividad de la mayoría de carboxipeptidasasas. En cambio, la tubCP es más sensible a la acción del dipéptido Z-Glu-Tyr, al igual que ocurre en esta proteína homóloga de Nna1 (Rodríguez de la Vega et al., 2007).

2000) al igual que ocurre con algunas formas de α- y β-tubulina, que incrementan su expresión durante el crecimiento de los axones en regeneración (Han et al., 2004); la actividad de la tubCP está, en parte, regulada por su sustrato (la Tyr-Tub) que está incrementada durante el crecimiento de las neuronas (Webster et al., 1992) y durante la regeneración axonal (Mullins et al., 1994). Esto coincide con el patrón de expresión de *nna1* durante la diferenciación y la regeneración. Durante el desarrollo la expresión de *nna1* se restringe a neuronas diferenciadas pero no a aquéllas proliferativas, compartiendo características con el patrón de expresión de la tubCP (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Existen evidencias en el ratón PCD (que carece de la expresión de *nna1*) que muestran que en las células mitrales se acumula la Tyr-Tub existiendo una deficiencia de expresión de la Glu-Tub (Kalinina et al., 2007). Esto revelaría que en el BO del PCD la tubCP no desempeña su función. Otro dato a favor de esta hipótesis es la semejanza que existe en el proceso degenerativo entre las neuronas talámicas afectadas tras una axotomía (Barron et al., 1973; Matthews, 1973) y las neuronas talámicas que degeneran como consecuencia de la mutación pcd (O´Gorman, 1985). Otra de las células afectadas por la mutación pcd son los espermatozoides (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002). Existen estudios que demuestran que la Δ-Tub (esencial en microtúbulos estables) es imprescindible durante la maduración de estas células (Paturle-Lafanechère et al., 1994; Kierszenbaum, 2002; Kato et al., 2004). Por lo tanto, en el caso de que Nna1 sea la tubCP, su ausencia en el ratón PCD provocaría que los espermatozoides presentasen algún tipo de disfunción. De hecho, los espermatozoides del ratón PCD presentan alteraciones morfológicas y funcionales (Landis y Mullen, 1978). Todos estos datos concordarían con el hecho de que la proteína Nna1 fuera la tubCP.

En el cerebelo de la rata el proceso de estabilización de microtúbulos (proceso en el que tiene lugar la destirosinación de la α-tubulina) ocurre a partir de P15, justo en el espacio temporal en el que comenzamos a detectar los signos pre-degenerativos en las CP en el ratón PCD. En el cerebelo, los axones están formados principalmente por microtúbulos estables (Cambray-Deakin y Burgone, 1987). Cuando existe desorganización de microtúbulos en los axones, y ausencia de microtúbulos estables, los axones exhiben una patología que muestra unos ensanchamientos de los axones adquiriendo así una forma ovalada con acumulación de orgánulos, sobre todo mitocondrias (Ertürk et al., 2007). La ausencia de la tubCP desencadenaría que la proporción de microtúbulos estables fuese muy baja en el citoesqueleto de las células. Nuestros resultados muestran alteraciones axonales conocidas como "torpedos" que son coincidentes con los observados en el trabajo de Ertürk y colaboradores (2007). Además, nuestros resultados demuestran cómo la β-tubulina, que dimeriza con la α-tubulina durante la estabilización de los microtúbulos, sufre una fuerte disminución de su expresión en las CP del ratón PCD desde P15 (ver Resultados).

Evidencias en contra

A pesar de lo expuesto anteriormente, algunos de los resultados de este trabajo plantean serias dudas sobre la función de Nna1 como tubCP. En el presente trabajo de Tesis

Doctoral hemos descrito el patrón de expresión de la Δ-Tub en las CP del ratón control. La expresión de esta proteína aumenta desde P15 hasta P25 coincidiendo con el proceso de estabilización de los microtúbulos de las CP. Estos datos coinciden con los publicados previamente, en el cerebelo de la rata (Paturle-Lafanechère et al., 1994). Sorprendentemente, en las CP del ratón PCD, ya desde P15 existe una expresión mayor de la Δ-Tub en las CP si se compara con el control. Si la proteína Nna1 fuese ciertamente la tubCP, lo que cabría encontrarse en el ratón PCD sería lo contrario: una acumulación de la forma tirosinada (Tyr-Tub) y una ausencia de las formas más estables de los microtúbulos (Glu-Tub y Δ-Tub), como ocurre en las células mitrales del BO del ratón PCD (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Además, nuestros análisis evidencian que en el animal control existe una fuerte expresión en los granos (ver Resultados), tanto de la Glu-Tub como de la Δ-Tub coincidiendo con datos previos (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987). Está descrito que los granos del cerebelo expresan el ARNm del gen *nna1*. Cabría esperar, por lo tanto, que en el ratón PCD existiera un déficit de estas formas estables de microtúbulos también en esas neuronas. Inesperadamente, este mismo patrón de expresión se mantiene en el mutante PCD a todas las edades. Se pueden plantear varias hipótesis que expliquen el porqué de esta situación. Se conoce la existencia de 5 proteínas del ratón que muestran una alta homología estructural con la proteína Nna1 (que también pertenecen a la familia M14D) y se ha propuesto que poseen las características estructurales para poder realizar funciones muy similares a la de Nna1 (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). En las CP del ratón se han detectado dos de éstas proteínas que pudieran quizás realizar la función que desempeñaba Nna1 (Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Otra posibilidad es que el enzima que lleve a cabo la transformación de Glu-Tub a Δ-Tub no sea Nna1 (y ninguna de sus homólogas). De ser así, este "enzima desconocida" pudiera sobreexpresarse intentando compensar la ausencia del Nna1, y por eso detectamos la Δ-tubulina fuertemente expresada en las CP del ratón PCD desde P15.

En condiciones normales, las CP del ratón control no muestran inmunorreactividad para la Glu-Tub, sólo las fibras de la glía de Bergmann lo hace (ver Resultados). Estos datos coinciden con los que se han descrito previamente en el cerebelo de la rata (Cambray-Deakin y Burgoyne, 1987). Nuestros resultados demuestran que en el cerebelo del ratón PCD existe mayor inmunorreactividad para la Glu-Tub en las fibras de la glía de Bergmann comparada con la del control. Si Nna1 fuera en verdad la tubCP y llevase a cabo las reacciones de destirosinación, habría que explicar cómo en el ratón PCD, que carece de la proteína Nna1, el grado de expresión de la Glu-Tub es mayor en la glía de Bergmann (Paturle-Lafanechère et al., 1994; Kalinina et al., 2007; Rodríguez de la Vega et al., 2007). Los estudios de hibridación *in situ* del ARNm del gen *nna1* demuestran que en el cerebelo la expresión de este ARNm se localiza en las CP y los granos, no así en la glía de Bergmann (Harris et al., 2000; Fernández-González et al., 2002), así que, en principio, la ausencia de Nna1 no debería influir de forma directa en las reacciones de tirosinación/destirosinación de la α-tubulina que puedan ocurrir en la glía de Bergmann. Una de las proteínas homólogas a

Nna1, conocida como CCP3 (del inglés: *Cytosolic Carboxi-Peptidase* 3) se expresa en la glía de Bergmann y no en las CP (Rodríguez de la Vega et al., 2007). Por otra parte, se sabe que durante la astrogliosis en el cerebelo, la glía de Bergmann sufre modificaciones estructurales en el citoesqueleto que necesitan de la estabilización de los microtúbulos (Gurland y Gundersen, 1995; Liao y Gundersen, 1998). Por lo tanto, se podría plantear que la mayor expresión de Glu-Tub en la glía de Bergmann del PCD es consecuencia del proceso de astrogliosis, y que esta reacción la llevase a cabo una proteína con características estructurales muy similares a Nna1, que no estuviera afectada por la mutación pcd.

Los resultados observados por otros grupos investigadores y los obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral no resuelven, sino que plantean más interrogantes acerca de la función de Nna1 como tubCP. Todos esto resultados en su conjunto sí parecen indicar que esta proteína está relacionada con la dinámica del citoesqueleto. Todas estas hipótesis necesitan más trabajos para resolverse, siendo el más importante, a nuestro parecer, el aislamiento y la purificación de la tubCP y el desarrollo de un anticuerpo eficaz que reconozca específicamente esta proteína en la célula.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en este Trabajo de Tesis Doctoral, y como consecuencia de los resultados obtenidos y de la discusión llevada a cabo, hemos llegado a las siguientes conclusiones:

I. La degeneración de las células de Purkinje en el ratón mutante PCD es muy rápida y severa, ocurre entre P20 y P30. La muerte de estas neuronas ocurre por dos mecanismos bien diferenciados, por apoptosis y por necrosis.

II. Los ratones PCD muestran menor habilidad motora que los ratones control, ya desde etapas pre-neurodegenerativas.

III. Entre P15 y P25 existe un incremento significativo de la expresión del gen *nna1* en el cerebelo del ratón mutante PCD. En el bulbo olfatorio, el nivel de expresión del este gen se mantiene invariable desde P10 hasta P80. Esta diferencia entre regiones puede ser una de las causas de las divergencias en la degeneración de las células de Purkinje y las células mitrales.

IV. La hibridación de *microarrays* del cerebelo muestra alteraciones en los niveles de expresión de numerosos genes involucrados en la muerte por apoptosis, la estabilidad del RER, los sistemas de reparación del ADN, la activación glial o el mantenimiento del citoesqueleto, entre otros.

V. La desaparición de las células de Purkinje en los ratones PCD está precedida por una etapa pre-neurodegenerativa caracterizada por la desestructuración del RER y alteraciones axonales y dendríticas fácilmente detectables con microscopía óptica y microscopía electrónica.

VI. En la etapa de pre-neurodegeneración en las células de Purkinje del ratón PCD se detectan grandes focos de rotura del ADN. Los mecanismos de reparación del material genético están fuertemente alterados lo que puede influir en la rápida transición de la fase pre-neurodegenerativa a la neurodegenerativa.

VII. La etapa pre-neurodegenerativa de las células de Purkinje del ratón PCD se caracteriza por una fuerte represión transcripcional y alteración de diversos compartimentos nucleares (nucleolo, cuerpo de Cajal y proteasoma 20S). Todas estas alteraciones nucleares y citoplasmáticas indican una disfunción general de la célula de Purkinje previa a su muerte, que pueden ser reflejo del comportamiento motor alterado en el ratón PCD.

VIII. La mayor nitrosilación de proteínas, la sobreexpresión del enzima iNOS y la guanilato ciclasa junto con la activación del proteasoma 20S, la desestructuración del RER y el aumento del daño del ADN son datos que apoyan la hipótesis de una elevación del grado de estrés oxidativo en la célula de Purkinje del ratón PCD.

IX. La mutación pcd induce la activación de la microglía y la astroglía en el cerebelo y el bulbo olfatorio. La gliosis que tiene lugar en el cerebelo es exacebarda, lo que probablemente acelere la muerte de las células de Purkinje, e induzca la apoptosis de los oligodendrocitos. Sin embargo, la respuesta glial provocada por la degeneración de las células mitrales es moderada y no parece influir en la muerte neuronal.

X. La función propuesta para la proteína Nna1 como tubulina carboxipeptidasa no se ajusta a los resultados obtenidos en el cerebelo del ratón mutante PCD, aunque sí parece estar implicada, directa o indirectamente, en la dinámica del citoesqueleto.

APÉNDICE

Soluciones de uso común

Fijador Somogyi sin glutaraldehído: compuesto por un 4% (p/v) de paraformadehído despolimerizado y un 0.2% (p/v) de ácido pícrico, tamponados a pH 7,4 con TF 0.1 M.

Medio de montaje para fluorescencia "anti-desvanecimiento": constituido por glicina 0.42% (p/v), NaOH 0.021% (p/v), NaCl 0.51% (p/v), *N*-propil-galato 5% (p/v), glicerol 70% (v/v) y timerosal 0.002% (p/v). Ha de guardarse protegido de la luz a 4 ºC.

Resina de inclusión en Durcupan:

- **Mezcla A**: para la preparación de la mezcla A se añade resina tipo epoxi (componente A) y endurecedor (componente B, Fluka) en una proporción 1:1 y plastificante (componente D; en una proporción 1:10 respecto a la resina epoxi y el endurecedor). Esta mezcla debe emulsionarse por agitación con lentitud, con el fin de que los 3 componentes queden correctamente mezclados. Esta mezcla es estable a TA.
- **Mezcla B**: para conseguir la mezcla B se añade el acelerador (componente C, Fluka) al 1.8% (v/v) a la mezcla A.

Resina de inclusión en Lowicryl: la resina (Polysciences, Eppelheim, Alemania) se prepara con tres componentes que son: a) crosslinker (4 g), b) monómero (26 g), y c) iniciador (0.15 g).

Solución de azul de toluidina: se obtiene mezclando 4 g de azul de toluidina con 5 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ en 500 ml de H_2O destilada.

Solución para gelatinizar portaobjetos: se disuelven 4.5 g de gelatina en polvo y 0.44 g de cromo III potasio sulfato en 900 ml de H_2O, calentando hasta 80 °C. Se filtra la solución y los portaobjetos limpios se sumergen en ella a 70 °C durante 5 min. Se dejan secar en la estufa una noche. Se repite la operación y se guardan en lugar seco.

Tampón 0.1% BSA-Tris, pH7.4: está compuesto de 20 mM de Tris-HCl, 0.9% (p/v) de NaCl, 0.1% (p/v) de BSA tipo V (Sigma).

Tampón citrato sódico salino (SSC) 20X: para preparar 50 ml, se disuelven 8.76 g de NaCl y 4.41 g de citrato sódico en H_2O_{DEPC}, ajustando el pH a 7.0. Se enrasa hasta 50 ml con H_2O_{DEPC}. Las distintas concentraciones utilizadas (10X, 2X, 0.5X, 0.1X) se preparan a partir de ésta haciendo las correspondientes diluciones con H_2O_{DEPC}.

Tampón de doble fuerza para microscopía electrónica: compuesto por dextrosa al 3,5% (p/v) en TF 0.24 M.

Tampón fosfato 0.1 M, pH 7.4 (25 ºC, TF): se prepara diluyendo 1:1 una solución de tampón fosfato 0.2 M en H_2O destilada.

Tampón fosfato 0.2 M, pH 7.4 (25 ºC): se obtiene mezclando soluciones 0.2 M de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 hasta alcanzar el pH deseado. Se conserva a TA.

Tampón fosfato salino 0.1 M, pH 7.4 (25 ºC, TFS): se han de mezclar en H_2O destilada: 8 g de NaCl, 0.2 g de KCl, 1.44 g de Na_2HPO_4 y 0.21 g de KH_2PO_4. Se ajusta el pH a 7.4 con HCl y se enrasa a 1 litro.

Tampón Tris 1 M, pH 8.0: se obtiene mezclando 121.4 g de Trizma-base y se enrasa hasta un litro de H_2O. Se ajusta el pH con HCl 1 M.

Tampón SSPE 20X, pH 7.4: se obtiene mezclando 175.3 g de NaCl, 27.6 g de NaH_2PO_4, 9.4 g de EDTA y se enrasa hasta 1 litro con H_2O.

Tampón Tris-HCl 0.2 M, pH 7.6 a 25 °C: se obtiene mezclando 24.24 g de Trizma-HCl y 5.56 g de Trizma-base en 1 litro de H_2O.

Tampón Tris-Borato-EDTA (TBE): para preparar 1 litro 10X, hay que disolver 108 g de Tris base (890 mM) y 55 g de ácido bórico (890 mM) en 40 ml de EDTA 0.5 M pH 8.0 (20 mM). Se conserva a temperatura ambiente. Para su uso (1X), se disuelve en la cantidad correspondiente de H_2O_{DEPC}.

Tampón TUNEL, pH 7.2 (25 ºC): Está compuesto por Tris-HCl 30 mM de pH 7.2, cacodilato sódico 0.14 M, $CoCl_2$ 1 mM y Triton X-100 0.3% (p/v).

Sueros inmunológicos

Anticuerpos primarios

Anti-53BP1. IgG de conejo anti-53BP1, Novus Biologicals, Colorado, EE.UU. El anticuerpo está dirigido contra la proteína tumoral humana 53BP1, en concreto contra una región codificada por los exones 11 y 12. Este anticuerpo también reacciona con la proteína 53BP1 de ratón.

Anti-ATM pS1981 (anti-pATM). IgG de conejo anti-pATM, Rockland, Pensilvania, EE.UU. El anticuerpo está dirigido contra la secuencia fosforilada en la serina 1981 del ATM humano que comprende los aminoácidos del 1974 al 1988.

Anti-calbindina (anti-CB) monoclonal. IgG de ratón anti-calbindina D-28k 300, Swant, Bellinzona, Suiza. Está dirigido contra la proteína calbindina D-28k de ratón. Tiene reacción cruzada con las proteínas de mono, conejo, rata, ratón y pollo, pero no con la de pez. No presenta reacción cruzada con la calretinina u otra proteína ligante de calcio conocida.

Anti-calbindina (anti-CB) policlonal. IgG de conejo anti-calbindina D-28k, Swant (CB-38), Bellinzona, Suiza. Está dirigido contra la proteína recombinante de rata calbindina D-28k. Tiene reacción cruzada con otras especies, incluido el humano.

Anti-coilina. IgG de conejo anti-coilina**.** Está dirigido contra los aminoácidos 393-407 de la secuencia de la coilina (Bohmann et al., 1995).

Anti-fibrilarina. IgG2α de ratón anti-fibrilarina**.** (Reimer et al., 1987)**.**

Anti-histona H2AX fosforilada (Anti-γ-H2AX). IgG de conejo anti-γ-H2AX, Chemicon, Temecula, California, EE.UU. El anticuerpo reacciona con la histona H2AX fosforilada en la serina 139 de humanos, mamíferos y levaduras.

Anti-histona H4 trimetilada en la lisina 20 (Anti-H4-K20-3Me). IgG de conejo, Upstate, Nueva York, EE.UU. El anticuerpo está dirigido contra la histona H4 trimetilada en la lisina 20 de humano.

Anti-proteína ácida fibrilar glial (Anti-GFAP) policlonal. IgG de conejo anti-GFAP, Sigma-Aldrich (G3893), Missouri, EE.UU. Es específico contra una proteína de 50 kDa de los filamentos intermedios de los astrocitos. El anticuerpo presenta reacción cruzada con la GFAP de humano, conejo y rata.

Anti-Iba 1 policlonal. IgG de conejo anti-Iba1, Wako, Osaka, Japón. Está dirigido contra un péptido sintético que corresponde a la zona carboxilo terminal de la proteína Iba1. Reconoce la proteína Iba1 de humano, rata y ratón.

Anti-MBP. IgG de conejo anti-MBP, Chemicon (AB5864), EE.UU. Reconoce la proteína básica de mielina de humano y conejo.

Anti-Olig2 policlonal. IgG de conejo anti-Olig2, Chemicon, EE.UU. Reconoce la proteína Olig2 de 32 kDa. Reconoce la proteína Iba1 de humano, rata y ratón.

Anti-α-tubulina (forma tirosinada). IgG de rata contra la forma tirosinada de la α-tubulina, Abcam (ab6160), Cambridge, Reino Unido.

Anti-α-tubulina (forma destirosinada). IgG de conejo contra la forma destirosinada de la α-tubulina, Millipore (AB3201), EE.UU.

Anti-β-tubulina III policlonal de conejo (Tuj1). IgG de ratón anti-β-tubulina III, Covance, California, EE.UU. Este anticuerpo está dirigido contra la β-tubulina III neuronal pero no reconoce la β-tubulina de las células gliales.

Anti-Δ-tubulina. IgG de conejo contra la forma no tirosinable de la α-tubulina, Millipore (AB3203), EE.UU.

Anticuerpos secundarios

Anti-conejo biotinado. IgG biotinada de cabra anti-IgG de conejo. Vector (BA-1000), California, EE.UU.

Anti-rata biotinado. IgG biotinada de cabra anti-IgG de rata. Vector (BA-9400), California, EE.UU.

Anti-conejo conjugado con Cy2 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (111-225-003), Pensilvania, EE.UU.

Anti-conejo conjugado con Cy3 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (111-165-003), Pensilvania, EE.UU.

Anti-ratón conjugado con Cy2 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (115-225-003), Pensilvania, EE.UU.

Anti-ratón conjugado con Cy3 hecho en cabra. Laboratorios Jackson (115-165-166), Pensilvania, EE.UU.

Estreptavidina conjugada con Cy3. Estreptavidina conjugada con el fluorocromo Cy3. Laboratorios Jackson (016-160-084), Pensilvania, EE.UU.

Estreptavidina conjugada con Cy2. Estreptavidina conjugada con el fluorocromo Cy2. Laboratorios Jackson (016-220-084), Pensilvania, EE.UU.

BIBLIOGRAFÍA

Abbott LC, Sotelo C. 2000. Ultrastructural analysis of catecholaminergic innervation in *weaver* and normal mouse cerebellar cortices. J Comp Neurol 426:316-329.

Alcalde I. 2003. Estudio neuroquímico del encéfalo del ratón mutante *pcd* y control. Trabajo de Grado de la Universidad de Salamanca.

Allin M, Matsumoto H, Santhouse AM, Nosarti C, AlAsady MH, Stewart AL, Rifkin L, Murray RM. 2001. Cognitive and motor function and the size of the cerebellum in adolescents born very pre-term. Brain 124:60-66.

Aloisi F. 2001. Immune function of microglia. Glia 36:165-179.

Altman J. 1972. Postnatal development of the cerebellar cortex in the rat. II. Phases in the maturation of Purkinje cells and of the molecular layer. J Comp Neurol 145:399-463.

Altman J, Bayer SA. 1985. Embryonic development of the rat cerebellum. III. Regional differences in the time of origin, migration, and settling of Purkinje cells. J Comp Neurol 231:42-65.

Álvarez-Buylla A, Seri B, Doetsch F. 2002. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull 57:751-758.

Ambrosi G, Flace P, Lorusso L, Girolamo F, Rizzi A, Bosco L, Errede M, Virgintino D, Roncali L, Benagiano V. 2007. Non-traditional large neurons in the granular layer of the cerebellar cortex. Eur J Histochem 1:59-64.

Anderson L, Henderson C, Adachi Y. 2001. Phosphorylation and rapid relocalization of 53BP1 to nuclear foci upon DNA damage. Mol Cell Biol 21:1719-1729.

Andrade LE, Chan EK, Raska I, Peebles CL, Roos G, Tan EM. 1991. Human autoantibody to a novel protein of the nuclear coiled body: immunological characterization and cDNA cloning of p80-coilin. J Exp Med 173:1407-1419.

Araque A. 2006. Astrocyte-neuron signaling in the brain--implications for disease. Curr Opin Investig Drugs 7:619-624.

Ares M Jr, Proudfoot NJ. 2005. The Spanish connection: transcription and mRNA processing get even closer. Cell 120:163-166.

Argarana CE, Barra HS, Caputto R. 1980. Tubulinyl-tyrosine carboxypeptidase from chicken brain: properties and partial purification. J Neurochem 34:114-118.

Armengol JA, Sotelo C. 1991. Early dendritic development of Purkinje cells in the rat cerebellum. A light and electron microscopic study using axonal tracing in '*in vitro*' slices. Dev Brain Res 64:95-114.

Armstrong CL, Krueger-Naug AM, Currie RW, Hawkes R. 2000. Constitutive expression of the 25-kDa heat shock protein Hsp25 reveals novel parasagittal bands of Purkinje cells in the adult mouse cerebellar cortex. J Comp Neurol 416:383-397.

Armstrong CL, Krueger-Naug AM, Currie RW, Hawkes R. 2001. Constitutive expression of heat shock protein Hsp25 in the central nervous system of the developing and adult mouse. J Comp Neurol 434:262-274.

Armstrong DM, Schild RF. 1970. A quantitative study of the Purkinje cells in the cerebellum of the albino rat. J Comp Neurol 139:449-456.

Bakkenist CJ, Kastan MB. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Nature 421:499-506.

Baptista CA, Hatten ME, Blazeski R, Mason CA. 1994. Cell-cell interactions influence survival and differentiation of purified Purkinje cells *in vitro*. Neuron 12:243-260.

Barra HS, Arce CA, Rodríguez JA, Caputto R. 1974. Some common properties of the protein that incorporates tyrosine as a single unit and the microtubule proteins. Biochem Biophys Res Commun 60:1384-1390.

Barra HS, Arce CA, Caputto R. 1980. Total tubulin and its aminoacylated and non-aminoacylated forms during the development of rat brain. Eur J Biochem 109:439-446.

Barra HS, Arce CA, Argarana CE. 1988. Posttranslational tyrosination/detyrosination of tubulin. Mol Neurobiol 2:133-153.

Barres BA. 2008. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. Neuron 60:430-440.

Barron KD, Means ED, Larsen E. 1973. Ultrastructure of retrograde degeneration in thalamus of rat. 1. Neuronal somata and dendrites. J Neuropath Exp Neurol 32:218-244.

Bartolomei JC, Greer CA. 1998. The organization of piriform cortex and the lateral olfactory tract following the loss of mitral cells in PCD mice. Exp Neurol 154:537-550.

Bartzokis G, Lu PH, Tishler TA, Fong SM, Oluwadara B, Finn JP, Huang D, Bordelon Y, Mintz J, Perlman S. 2007. Myelin breakdown and iron changes in Huntington's disease: pathogenesis and treatment implications. Neurochem Res 32:1655-1664.

Bäurle J, Grüsser-Cornehls U. 1997. Differential number of glycine- and GABA-immunopositive neurons and terminals in the deep cerebellar nuclei of normal and Purkinje cell degeneration mutant mice. J Comp Neurol 382:443-458.

Bäurle J, Helmchen C, Grüsser-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 384:580-596.

Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. Behav Brain Res 125:279-284.

Berciano MT, Villagra NT, Pena E, Navascués J, Casafont I, Lafarga M. 2002. Structural and functional compartmentalization of the cell nucleus in supraoptic neurons. Microsc Res Tech 56:132-142.

Berciano MT, Novell M, Villagra NT, Casafont I, Bengoechea R, Val-Bernal JF, Lafarga M. 2007. Cajal body number and nucleolar size correlate with the cell body mass in human sensory ganglia neurons. J Struct Biol 158:410-420.

Bernardi R, Pandolfi PP. 2007. Structure, dynamics and functions of promyelocytic leukaemia nuclear bodies. Nat Rev Mol Cell Biol 8:1006-1116.

Berretta S, Perciavalle V, Poppele RE. 1991. Origin of spinal projections to the anterior and posterior lobes of the rat cerebellum. J Comp Neurol 305:273-281.

Berry M, Bradley P. 1976. The growth of the dendritic trees of Purkinje cells in the cerebellum of the rat. Brain Res 112:1-35.

Beven AF, Simpson GG, Brown JW, Shaw PJ. 1995. The organization of spliceosomal components in the nuclei of higher plants. J Cell Sci 108:509-518.

Biber K, Neumann H, Inoue K, Boddeke HW. 2007. Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. Trends Neurosci 30:596-602.

Blackburn EH. 1991. Structure and function of telomeres. Nature 350:569-572.

Blanks JC, Mullen RJ, LaVail MM. 1982. Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. II. Electron microscopic analysis. J Comp Neurol 212:231-246.

Bohmann K, Ferreira J, Santama N, Weis K, Lamond AI. 1995. Molecular analysis of the coiled body. J Cell Sci 19:107-113.

Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. 2007. The multifunctional nucleolus. Nat Rev Mol Cell Biol 8:574-585.

Boje KM, Arora PK. 1992. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. Brain Res 587:250-256.

Bolderson E, Scorah J, Helleday T, Smythe C, Meuth M. 2004. ATM is required for the cellular response to thymidine induced replication fork stress. Hum Mol Genet 13:2937-2945.

Borovjagin AV, Gerbi SA. 2004. Xenopus U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction. RNA 10:942-953.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254.

Brautigam VM, Frasier C, Nikodemova M, Watters JJ. 2005. Purinergic receptor modulation of BV-2 microglial cell activity: potential involvement of p38 MAP kinase and CREB. J Neuroimmunol 166:113-125.

Brooks PJ. 2002. DNA repair in neural cells: basic science and clinical implications. Mutat Res 509:93-108.

Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ. 2001. ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. J Biol Chem 276:42462-42467.

Caldecott KW. 2004. DNA single-strand breaks and neurodegeneration. DNA Repair 3:875-882.

Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD. 1987. Acetylated and detyrosinated alpha-tubulins are co-localized in stable microtubules in rat meningeal fibroblasts. Cell Motil Cytoskeleton 8:284-291.

Campbell DB, Hess EJ. 1996. Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering (tg), Purkinje cell degeneration (pcd), and nervous (nr). Brain Res Mol 37:79-84.

Carmo-Fonseca M. 2002. The contribution of nuclear compartmentalization to gene regulation. Cell 108:513-521.

Carmo-Fonseca M, Pepperkok R, Carvalho MT, Lamond AI. 1992. Transcription-dependent colocalization of the U1, U2, U4/U6, and U5 snRNPs in coiled bodies. J Cell Biol 117:1-14.

Carmo-Fonseca M, Ferreira J, Lamond AI. 1993. Assembly of snRNP-containing coiled bodies is regulated in interphase and mitosis--evidence that the coiled body is a kinetic nuclear structure. J Cell Biol 120:841-852.

Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. Nat Cell Biol 2:107-112.

Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3erd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. 1998. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. Cell 93:477-486.

Carvalho C, Pereira HM, Ferreira J, Pina C, Mendonça D, Rosa AC, Carmo-Fonseca M. 2001. Chromosomal G-dark bands determine the spatial organization of centromeric heterochromatin in the nucleus. Mol Biol Cell 12:3563-3572.

Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M. 1999. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: A link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body. J Cell Biol 147:715-728.

Casafont I, Navascués J, Pena E, Lafarga M, Berciano MT. 2006. Nuclear organization and dynamics of transcription sites in rat sensory ganglia neurons detected by incorporation of 5'-fluorouridine into nascent RNA. Neuroscience 140:453-462.

Chakrabarti L, Neal JT, Miles M, Martínez RA, Smith AC, Sopher BL, La Spada AR. 2006. The Purkinje cell degeneration 5J mutation is a single amino acid insertion that destabilizes Nna1 protein. Mamm Genome 17:103-110.

Chakrabarti L, Eng J, Martínez RA, Jackson S, Huang J, Possin DE, Sopher BL, La Spada AR. 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 48:1999-2005.

Chan-Palay V. 1972. The tripartite structure of the undercoat in initial segments of Purkinje cell axons. Z Anat Entwicklungsgesch 139:1-10.

Chen L, Bao S, Lockard JM, Kim JK, Thompson RF. 1996. Impaired classical eyeblink conditioning in cerebellar-lesioned and Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. J Neurosci 16:2829-2838.

Cheutin T, O'Donohue MF, Beorchia A, Vandelaer M, Kaplan H, Deféver B, Ploton D, Thiry M. 2002. Three-dimensional organization of active rRNA genes within the nucleolus. J Cell Sci 115:3297-3307.

Cioce M, Lamond AI. 2005. Cajal bodies: a long history of discovery. Annu Rev Cell Dev Biol 21:105-131.

Cleveland DW, Sullivan KF. 1985. Molecular biology and genetics of tubulin. Annu Rev Biochem 54:331-365.

Cmarko D, Verschure PJ, Martin TE, Dahmus ME, Krause S, Fu XD, van Driel R, Fakan S. 1999. Ultrastructural analysis of transcription and splicing in the cell nucleus after bromo-UTP microinjection. Mol Biol Cell 10:211-223.

Cmarko D, Smigova J, Minichova L, Popov A. 2008. Nucleolus: the ribosome factory. Histol Histopathol 23:1291-1298.

Courville J, Faraco-Cantin F. 1978. On the origin of the climbing fibers of the cerebellum. An experimental study in the cat with an autoradiographic tracing method. Neuroscience 3:797-809.

Cremer T, Cremer C. 2001. Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells. Nat Rev Genet 2:292-301.

Cremer T, Kupper K, Dietzel S, Fakan S. 2004. Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function. Biol Cell 96:555-567.

Cremer T, Cremer M, Dietzel S, Müller S, Solovei I, Fakan S. 2006. Chromosome territories-a functional nuclear landscape. Curr Opin Cell Biol 18:307-316.

Curatolo L, Valsasina B, Caccia C, Raimondi GL, Orsini G, Bianchetti A. 1997. Recombinant human IL-2 is cytotoxic to oligodendrocytes after *in vitro* self aggregation. Cytokine 9:734-739.

D'Amours D, Jackson SP. 2002. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3:317-327.

Darzacq X, Jády BE, Verheggen C, Kiss AM, Bertrand E, Kiss T. 2002. Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs. EMBO J 21:2746-2756.

Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB. 2005. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury *in vivo*. Nat Neurosci 8:752-758.

Davie JT, Clark BA, Häusser M. 2008. The origin of the complex spike in cerebellar Purkinje cells. J Neurosci 28:7599-7609.

Davies KJ. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. Biochimie 83:301-310.

Derenzini M, Pasquinelli G, O'Donohue MF, Ploton D, Thiry M. 2006. Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. J Histochem Cytochem 54:131-145.

Desclin JC. 1974. Histological evidence supporting the inferior olive as the major source of cerebellar climbing fibers in the rat. Brain Res 77:365-384.

Dillon N. 2006. Gene regulation and large-scale chromatin organization in the nucleus. Chromosome Res 14:117-126.

Dimario PJ. 2004. Cell and molecular biology of nucleolar assembly and disassembly. Int Rev Cytol 239:99-178.

Diño MR, Willard FH, Mugnaini E. 1999. Distribution of unipolar brush cells and other calretinin immunoreactive components in the mammalian cerebellar cortex. J Neurocytol 28:99-123.

Djurisic M, Antic S, Chen WR, Zecevic D. 2004. Voltage imaging from dendrites of mitral cells: EPSP attenuation and spike trigger zones. J Neurosci 24:6703-6714.

Duchala CS, Shick HE, García J, Deweese DM, Sun X, Stewart VJ, Macklin WB. 2004. The toppler mouse: a novel mutant exhibiting loss of Purkinje cells. J Comp Neurol 476:113-129.

Dugué GP, Dumoulin A, Triller A, Dieudonné S. 2005. Target-dependent use of co-released inhibitory transmitters at central synapses. J Neurosci 25:6490-6498.

Eccles JC, Sasaki K, Strata P. 1967. A comparison of the inhibitory actions of Golgi cells and of basket cells. Exp Brain Res 3:81-94.

Ekerot CF, Jörntell H, Garwicz M. 1995. Functional relation between corticonuclear input and movements evoked on microstimulation in cerebellar nucleus interpositus anterior in the cat. Exp Brain Res 106:365-376.

Ersfeld K, Wehland J, Plessmann U, Dodemont H, Gerke V, Weber K. 1993. Characterization of the tubulin-tyrosine ligase. J Cell Biol 120:725-732.

Ertürk A, Hellal F, Enes J, Bradke F. 2007. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. J Neurosci 27:9169-9180.

Escartin C, Bonvento G. 2008. Targeted activation of astrocytes: a potential neuroprotective strategy. Mol Neurobiol 38:231-241.

Escubedo E, Guitart L, Sureda FX, Jiménez A, Pubill D, Pallàs M, Camins A, Camarasa J. 1998. Microgliosis and down-regulation of adenosine transporter induced by methamphetamine in rats. Brain Res 814:120-126.

Fakan S. 1986. Structural support for RNA synthesis in the cell nucleus. Methods Achiev Exp Pathol 12:105-140.

Fakan S. 1994. Perichromatin fibrils are *in situ* forms of nascent transcripts. Trends Cell Biol 4:86-90.

Fakan S, Puvion E. 1980. The ultrastructural visualization of nucleolar and extranucleolar RNA synthesis and distribution. Int Rev Cytol 65:255-299.

Fakan S, van Driel R. 2007. The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding. Semin Cell Dev Biol 18:676-681.

Felten DL, Felten SY, Perry KW, Fuller RW, Nurnberger JI, 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 18:783-793.

Fernández-Capetillo O, Lee A, Nussenzweig M, Nussenzweig A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. DNA Repair 3:959-967.

Fernández-González A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI, Zuo J. 2002. Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes caused by mutations in the axotomy-induced gene, Nna1. Science 295:1904-1906.

Ferreira J, Paolella G, Ramos C, Lamond AI. 1997. Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories. J Cell Biol 139:1597-1610.

Florez-McClure ML, Linseman DA, Chu CT, Barker PA, Bouchard RJ, Le SS, Laessig TA, Heidenreich KA. 2004. The p75 neurotrophin receptor can induce autophagy and death of cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 24:4498-4509.

Ford GD, Ford BD, Steele EC Jr, Gates A, Hood D, Matthews MA, Mirza S, Macleish PR. 2008. Analysis of transcriptional profiles and functional clustering of global cerebellar gene expression in PCD3J mice. Biochem Biophys Res Commun 377:556-561.

Forstreuter F, Lucius R, Mentlein R. 2002. Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells. J Neuroimmunol 132:93-98.

Fox AH, Lam YW, Leung AK, Lyon CE, Andersen J, Mann M, Lamond AI. 2002. Paraspeckles: a novel nuclear domain. Curr Biol 12:13-25.

Fox CA. 1959. The intermediate cells of Lugaro in the cerebellar cortex of the monkey. J Comp Neurol 112:39-53.

Fragioudaki K, Giompres P, Smith AL, Triarhou LC, Kouvelas ED, Mitsacos A. 2002. AMPA receptor subunit RNA transcripts and [(3)H]AMPA binding in the cerebellum of normal and pcd mutant mice: an *in situ* hybridization study combined with receptor autoradiography. J Neural Transm 109:1115-1127.

Francisconi S, Codenotti M, Ferrari-Toninelli G, Uberti D, Memo M. 2005. Preservation of DNA integrity and neuronal degeneration. Brain Res Rev 48:347-351.

Frezik J. 1963. Associative connections established by Purkinje axon collaterals between different parts of the cerebellar cortex. Acta Morphol Acad Sci Hung 12:9-13.

Friedman D, Strowbridge BW. 2000. Functional role of NMDA autoreceptors in olfactory mitral cells. J Neurophysiol 84:39-50.

Gall JG. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. Annu Rev Cell Dev Biol 16:273-300.

Gall JG. 2001. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. FEBS Lett 498:164-167.

Gama-Carvalho M, Krauss RD, Chiang L, Valcárcel J, Green MR, Carmo-Fonseca M. 1997. Targeting of U2AF65 to sites of active splicing in the nucleus. J Cell Biol 137:975-987.

Gard DL, Kirschner MW. 1985. A polymer-dependent increase in phosphorylation of beta-tubulin accompanies differentiation of a mouse neuroblastoma cell line. J Cell Biol 100:764-774.

Garden GA, Möller T. 2006. Microglia biology in health and disease. J Neuroimmune Pharmacol 1:127-137.

Gerbi SA, Borovjagin AV, Lange TS. 2003. The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. Curr Opin Cell Biol 15:318-325.

Ghetti B, Norton J, Triarhou LC. 1987. Nerve cell atrophy and loss in the inferior olivary complex of "Purkinje cell degeneration" mutant mice. J Comp Neurol 260:409-422.

Ghetti B, Perry KW, Fuller RW. 1988. Serotonin concentration and turnover in cerebellum and other brain regions of pcd mutant mice. Brain Res 458:367-371.

Girard C, Neel H, Bertrand E, Bordonné R. 2006. Depletion of SMN by RNA interference in HeLa cells induces defects in Cajal body formation. Nucleic Acids Res 34:2925-2932.

Golding SE, Rosenberg E, Khalil A, McEwen A, Holmes M, Neill S, Povirk LF, Valerie K. 2004. Double strand break repair by homologous recombination is regulated by cell cycle-independent signaling via ATM in human glioma cells. J Biol Chem 279:15402-15410.

Goodlett CR, Hamre KM, West JR. 1992. Dissociation of spatial navigation and visual guidance performance in Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. Behav Brain Res 47:129-141.

Görisch SM, Wachsmuth M, Tóth KF, Lichter P, Rippe K. 2005. Histone acetylation increases chromatin accessibility. J Cell Sci 118:5825-5834.

Granados-Fuentes D, Saxena MT, Prolo LM, Aton SJ, Herzog ED. 2004. Olfactory bulb neurons express functional, entrainable circadian rhythms. Eur J Neurosci 19:898-906.

Granneman S, Baserga SJ. 2005. Crosstalk in gene expression: coupling and co-regulation of rDNA transcription, pre-ribosome assembly and pre-rRNA processing. Curr Opin Cell Biol 17:281-286.

Greer CA, Shepherd GM. 1982. Mitral cell degeneration and sensory function in the neurological mutant mouse Purkinje cell degeneration (PCD). Brain Res 235:156-161.

Griesser CA, Cuenod M, Henke H. 1982. Kainic acid receptor sites in the cerebellum of nervous, Purkinje cell degeneration, reeler, staggerer and weaver mice mutant strains. Brain Res 246:265-271.

Grillo MA. 1970. Cytoplasmic inclusions resembling nucleoli in sympathetic neurons of adult rats. J Cell Biol 45:100-117.

Grune T, Reinheckel T, Joshi M, Davies KJ. 1995. Proteolysis in cultured liver epithelial cells during oxidative stress. Role of the multicatalytic proteinase complex, proteasome. J Biol Chem 270:2344-2351.

Grüsser-Cornehls U, Bäurle J. 2001. Mutant mice as a model for cerebellar ataxia. Prog Neurobiol 63:489-540.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. 2002. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. Science 297:1186-1190.

Gundersen GG, Bulinski JC. 1986. Distribution of tyrosinated and nontyrosinated alpha-tubulin during mitosis. J Cell Biol 102:1118-1126.

Gurland G, Gundersen GG. 1995. Stable, detyrosinated microtubules function to localize vimentin intermediate filaments in fibroblasts. J Cell Biol 131:1275-1290.

Hadjiolov AA. 1985. The nucleolus and ribosome biogenesis. Springer, Nueva York.

Halassa MM, Fellin T, Haydon PG. 2007. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. Trends Mol Med 13:54-63.

Hallak ME, Rodríguez JA, Barra HS, Caputto R. 1977. Release of tyrosine from tyrosinated tubulin. Some common factors that affect this process and the assembly of tubulin. FEBS Lett 73:147-150.

Han PJ, Shukla S, Subramanian PS, Hoffman PN. 2004. Cyclic AMP elevates tubulin expression without increasing intrinsic axon growth capacity. Exp Neurol 189:293-302.

Hanisch UK. 2002. Microglia as a source and target of cytokines. Glia 40:140-155.

Harris A, Morgan JI, Pecot M, Soumare A, Osborne A, Soares HD. 2000. Regenerating motor neurons express Nna1, a novel ATP/GTP-binding protein related to zinc carboxypeptidases. Mol Cell Neurosci 16:578-596.

Hashimoto M, Mikoshiba K. 2003. Mediolateral compartmentalization of the cerebellum is determined on the "birth date" of Purkinje cells. J Neurosci 23:11342-11351.

Hatten ME, Heintz N. 1995. Mechanisms of neural patterning and specification in the developing cerebellum. Annu Rev Neurosci 18:385-408.

Hawkes R. 1992. Antigenic markers of cerebellar modules in the adult mouse. Biochem Soc Trans 20:391-395.

Hawkes R, Eisenman LM. 1997. Stripes and zones: the origins of regionalization of the adult cerebellum. Perspect Dev Neurobiol 5:95-105.

Hawkes R, Leclerc N. 1986. Immunocytochemical demonstration of topographic ordering of Purkinje cell axon terminals in the fastigial nuclei of the rat. J Comp Neurol 244:481-491.

Hawkes R, Mascher C. 1994. The development of molecular compartmentation in the cerebellar cortex. Acta Anat 151:139-149.

Helleday T, Lo J, van Gent DC, Engelward BP. 2007. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. DNA Repair 6:923-935.

Hendzel MJ, Kruhlak MJ, Bazett-Jones DP. 1998. Organization of highly acetylated chromatin around sites of heterogeneous nuclear RNA accumulation. Mol Biol Cell 9:2491-2507.

Hernández-Verdún D, Louvet E. 2004. The nucleolus: structure, functions, and associated diseases. Med Sci 20:37-44.

Hernández-Verdún D. 2006. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. Histochem Cell Biol 126:135-148.

Herndon RM. 1963. The fine structure of the Purkinje cell. J Cell Biol 18:167-180.

Hirano A, Dembitzer HM. 1973. Cerebellar alterations in the weaver mouse. J Cell Biol 56:478-486.

Hisahara S, Shoji S, Okano H, Miura M. 1997. ICE/CED-3 family executes oligodendrocyte apoptosis by tumor necrosis factor. J Neurochem 69:10-20.

Honda S, Nakajima K, Nakamura Y, Imai Y, Kohsaka S. 1999. Rat primary cultured microglia express glial cell line-derived neurotrophic factor receptors. Neurosci Lett 275:203-206.

Huang S. 2002. Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? J Cell Biol 157:739-741.

Huang S, Spector DL. 1992. U1 and U2 small nuclear RNAs are present in nuclear speckles. Proc Natl Acad Sci USA 89:305-308.

Huang S, Deerinck TJ, Ellisman MH, Spector DL. 1998. The perinucleolar compartment and transcription. J Cell Biol 143:35-47.

Huyen Y, Zgheib O, Ditullio RA, Jr., Gorgoulis VG, Zacharatos P, Petty TJ, Sheston EA, Mellert HS, Stavridi ES, Halazonetis TD. 2004. Methylated lysine 79 of histone H3 targets 53BP1 to DNA double-strand breaks. Nature 432:406-411.

Iijima K, Ohara M, Seki R, Tauchi H. 2008. Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. J Radiat Res 49:451-464.

Inoue K. 2006. ATP receptors of microglia involved in pain. Novartis Found Symp 276:263-272.

Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP. 2003. Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. Nucleic Acids Res 31:15.

Ito M. 1984. The modifiable neuronal network of the cerebellum. Jpn J Physiol 34:781-792.

Ito M. 2006. Cerebellar circuitry as a neuronal machine. Prog Neurobiol 78:272-303.

Ito M. 2008. Control of mental activities by internal models in the cerebellum. Nat Rev Neurosci 9:304-313.

Jaarsma D, Ruigrok TJ, Caffé R, Cozzari C, Levey AI, Mugnaini E, Voogd J. 1997. Cholinergic innervation and receptors in the cerebellum. Prog Brain Res 114:67-96.

Jády BE, Darzacq X, Tücker KE, Matera AG, Bertrand E, Kiss T. 2003. Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm. EMBO J 22:1878-1888.

Jády BE, Bertrand E, Kiss T. 2004. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. J Cell Biol 164:647-652.

Jiang G, Yang F, Sánchez C, Ehrlich M. 2004. Histone modification in constitutive heterochromatin versus unexpressed euchromatin in human cells. J Cell Biochem 93:286-300.

Jin J, Cai Y, Li B, Conaway RC, Workman JL, Conaway JW, Kusch T. 2005. In and out: histone variant exchange in chromatin. Trends Biochem Sci 30:680-687.

Kalinina E, Biswas R, Berezniuk I, Hermoso A, Avilés FX, Fricker LD. 2007. A novel subfamily of mouse cytosolic carboxypeptidases. FASEB J 21:836-850.

Karst SY, Ward-Bailey PF, Samples R, Johnson KR, Donahue LR, Davisson MT. 2008. Purkinje cell degeneration 8 Jackson, a remutation to the *Agtphp1* gene MGI Direct Data.

Kato A, Nagata Y, Todokoro K. 2004. Delta-tubulin is a component of intercellular bridges and both the early and mature perinuclear rings during spermatogenesis. Dev Biol 269:196-205.

Kettenmann H, Ransom BR. 2005. Neuroglia. Oxford: Oxford University Press.

Khan MA. 1993. Histochemical and ultrastructural investigation of heterogeneous Purkinje neurons in mammalian cerebellum. Cell Mol Biol Res 39:789-795.

Kierszenbaum AL. 2002. Sperm axoneme: a tale of tubulin posttranslation diversity. Mol Reprod Dev 62:1-3.

Kim JJ, Thompson RF. 1997. Cerebellar circuits and synaptic mechanisms involved in classical eyeblink conditioning. Trends Neurosci 20:177-181.

Kim SU, de Vellis J. 2005. Microglia in health and disease. J Neurosci Res 81:302-313.

Klingauf M, Stanek D, Neugebauer KM. 2006. Enhancement of U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle association in Cajal bodies predicted by mathematical modeling. Mol Biol Cell 17:4972-4981.

Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H. 2008. Current topics in DNA double-strand break repair. J Radiat Res 49:93-103.

Korn T. 2008. Pathophysiology of multiple sclerosis. J Neurol 255:2-6.

Kourmouli N, Jeppesen P, Mahadevhaiah S, Burgoyne P, Wu R, Gilbert DM, Bongiorni S, Prantera G, Fanti L, Pimpinelli S, Shi W, Fundele R, Singh PB. 2004. Heterochromatin and tri-methylated lysine 20 of histone H4 in animals. J Cell Sci 117:2491-2501.

Kreutzberg GW. 1996. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. Trends Neurosci 19:312-318.

Krysko DV, D'Herde K, Vandenabeele P. 2006. Clearance of apoptotic and necrotic cells and its immunological consequences. Apoptosis 11:1709-1726.

Kühn U, Wahle E. 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. Biochim Biophys Acta 1678:67-84.

Kurz EU, Lees-Miller SP. 2004. DNA damage-induced activation of ATM and ATM-dependent signaling pathways. DNA Repair 3:889-900.

Kyuhou S, Kato N, Gemba H. 2006. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. Neurosci Lett 396:91-96.

Lachner M, O'Carroll D, Rea S, Mechtler K, Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. Nature 410:116-120.

Lafarga M, Andrés MA, Berciano MT, Maquiera E. 1991. Organization of nucleoli and nuclear bodies in osmotically stimulated supraoptic neurons of the rat. J Comp Neurol 308:329-339.

Lafarga M, Berciano MT, García-Segura LM, Andrés MA, Carmo-Fonseca M. 1998. Acute osmotic/stress stimuli induce a transient decrease of transcriptional activity in the neurosecretory neurons of supraoptic nuclei. J Neurocytol 27:205-217.

Lafarga M, Casafont I, Bengoechea R, Tapia O, Berciano MT. 2009. Cajal's contribution to the knowledge of the neuronal cell nucleus. Chromosoma (en prensa).

Lainé J, Axelrad H. 1994. The candelabrum cell: a new interneuron in the cerebellar cortex. J Comp Neurol 339:159-173.

Lamond AI, Carmo-Fonseca M. 1993. Localisation of splicing snRNPs in mammalian cells. Mol Biol Rep 18:127-133.

Lamond AI, Earnshaw WC. 1998. Structure and function in the nucleus. Science 280:547-553.

Landis DM, Reese TS. 1974. Differences in membrane structure between excitatory and inhibitory synapses in the cerebellar cortex. J Comp Neurol 155:93-125.

Landis SC. 1973. Ultrastructural changes in the mitochondria of cerebellar Purkinje cells of nervous mutant mice. J Cell Biol 57:782-797.

Landis SC, Mullen RJ. 1978. The development and degeneration of Purkinje cells in pcd mutant mice. J Comp Neurol 177:125-143.

Larramendi LM. 1969. Electron microscopic studies of cerebellar interneurons. UCLA Forum Med Sci 11:289-307.

LaVail MM, Blanks JC, Mullen RJ. 1982. Retinal degeneration in the pcd cerebellar mutant mouse. I. Light microscopic and autoradiographic analysis. J Comp Neurol 212:217-230.

Le Marec N, Lalonde R. 1997. Sensorimotor learning and retention during equilibrium tests in Purkinje cell degeneration mutant mice. Brain Res 768:310-316.

Le Marec N, Hébert C, Amdiss F, Botez MI, Reader TA. 1998. Regional distribution of 5-HT transporters in the brain of wild type and 'Purkinje cell degeneration' mutant mice: a quantitative autoradiographic study with [3H]citalopram. J Chem Neuroanat 15:155-171.

Lee JH, Paull TT. 2007. Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks. Oncogene 26:7741-7748.

Lemm I, Girard C, Kuhn AN, Watkins NJ, Schneider M, Bordonné R, Lührmann R. 2006. Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. Mol Biol Cell 17:3221-3231.

Lewis SE, Mannion RJ, White FA, Coggeshall RE, Beggs S, Costigan M, Martin JL, Dillmann WH, Woolf CJ. 1999. A role for HSP27 in sensory neuron survival. J Neurosci 19:8945-8953.

L'Hernault SW, Rosenbaum JL. 1985. Reversal of the posttranslational modification on Chlamydomonas flagellar alpha-tubulin occurs during flagellar resorption. J Cell Biol 100:457-462.

Li J, Ramenaden ER, Peng J, Koito H, Volpe JJ, Rosenberg PA. 2008. Tumor necrosis factor alpha mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present. J Neurosci 28:5321-5330.

Liao G, Gundersen GG. Kinesin is a candidate for cross-bridging microtubules and intermediate filaments. 1998. Selective binding of kinesin to detyrosinated tubulin and vimentin. J Biol Chem 273:9797-9803.

Lin SC, Huck JH, Roberts JD, Macklin WB, Somogyi P, Bergles DE. 2005. Climbing fiber innervation of NG2-expressing glia in the mammalian cerebellum. Neuron 46:773-785.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)). Methods 25:402-408.

Llorente B, Symington LS. 2004. The Mre11 nuclease is not required for 5' to 3' resection at multiple HO-induced double-strand breaks. Mol Cell Biol 24:9682-9694.

Louis EJ, Vershinin AV. 2005. Chromosome ends: different sequences may provide conserved functions. Bioessays 27:685-697.

Louvet E, Junéra HR, Le Panse S, Hernandez-Verdun D. 2005. Dynamics and compartmentation of the nucleolar processing machinery. Exp Cell Res 304:457-470.

Lowe G. 2003. Flash photolysis reveals a diversity of ionotropic glutamate receptors on the mitral cell somatodendritic membrane. J Neurophysiol 90:1737-1746.

Lydall D, Whitehall S. 2005. Chromatin and the DNA damage response. DNA Repair 4:1195-1207.

Madalosso SH, Pérez-Villegas EM, Armengol JA. 2005. Naturally occurring neuronal death during the postnatal development of Purkinje cells and their precerebellar afferent projections. Brain Res Rev 49:267-279.

Maison C, Almouzni G. 2004. HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. Nat Rev Mol Cell Biol 5:296-304.

Makowiec RL, Cha JJ, Penney JB, Young AB. 1991. Cerebellar excitatory amino acid binding sites in normal, granuloprival, and Purkinje cell-deficient mice. Neuroscience 42:671-681.

Marani E. 1977. The subcellular distribution of 5'-nucleotidase activity in mouse cerebellum. Exp Neurol 57:1042-1048.

Marchena M. 2008. El ratón PCD/PCD como modelo de degeneración de fotorreceptores. Estudio estructural y funcional. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

Marcoli M, Maura G, Cervetto C, Giacomini C, Oliveri D, Candiani S, Pestarino M. 2006. Nitric oxide-evoked cGMP production in Purkinje cells in rat cerebellum: an immunocytochemical and pharmacological study. Neurochem Int 49:683-690.

Matera AG, Ward DC. 1993. Nucleoplasmic organization of small nuclear ribonucleoproteins in cultured human cells. J Cell Biol 121:715-727.

Matera AG, Frey MR. 1998. Coiled bodies and gems: Janus or gemini? Am J Hum Genet 63:317-321.

Matthews MA. 1973. Death of the central neuron: an electron microscopic study of thalamic retrograde degeneration following cortical ablation. J Neurocytol 2:265-288.

Mattick JS. 2004. RNA regulation: a new genetics? Nat Rev Genet 5:316-323.

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ. 2007. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. Science 316:1160-1166.

McCrea RA, Bishop GA, Kitai ST. 1976. Intracellular staining of Purkinje cells and their axons with horseradish peroxidase. Brain Res 118:132-136.

McGowan CH, Russell P. 2004. The DNA damage response: sensing and signaling. Curr Opin Cell Biol 16:629-633.

McKinnon PJ. 2004. ATM and ataxia telangiectasia. EMBO Rep 5:772-776.

McKinnon PJ. 2009. DNA repair deficiency and neurological disease. Nat Rev Neurosci 10:100-112.

McTigue DM, Tripathi RB. 2008. The life, death, and replacement of oligodendrocytes in the adult CNS. J Neurochem 107:1-19.

Meaburn KJ, Misteli T. 2007. Cell biology: chromosome territories. Nature 445:379-781.

Mélèse T, Xue Z. 1995. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. Curr Opin Cell Biol 7:319-324.

Melo J, Toczyski D. 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. Curr Opin Cell Biol 14:237-245.

Mengual E, Arizti P, Rodrigo J, Giménez-Amaya JM, Castaño JG. 1996. Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. J Neurosci 16:6331-6341.

Miale IL, Sidman RL. 1961. An autoradiographic analysis of histogenesis in the mouse cerebellum. Exp Neurol 4:277-296.

Miller BA, Crum JM, Tovar CA, Ferguson AR, Bresnahan JC, Beattie MS. 2007. Developmental stage of oligodendrocytes determines their response to activated microglia *in vitro*. J Neuroinflammation 4:28.

Milligan ED, Watkins LR. 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. Nat Rev Neurosci 10:23-36.

Minghetti L. 2005. Role of inflammation in neurodegenerative diseases. Curr Opin Neurol 18:315-321.

Misteli T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. J Cell Sci 113:1841-1849.

Misteli T. 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. Science 291:843-847.

Misteli T. 2005. Concepts in nuclear architecture. Bioessays 27:477-487.

Misteli T, Cáceres JF, Spector DL. 1997. The dynamics of a pre-mRNA splicing factor in living cells. Nature 387:523-527.

Monneron A, Bernhard W. 1969. Fine structural organization of the interphase nucleus in some mammalian cells. J Ultrastruct Res 27:266-288.

Morris GE. 2008. The Cajal body. Biochim Biophys Acta 1783:2108-2115.

Mugnaini E, Dino MR, Jaarsma D. 1997. The unipolar brush cells of the mammalian cerebellum and cochlear nucleus: cytology and microcircuitry. Prog Brain Res 114:131-150.

Mullen RJ, LaVail M. 1975. Two types of retinal degeneration in cerebellar mutant mice. Nature 258:528-530.

Mullen RJ, Eicher EM, Sidman RL. 1976. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. Proc Natl Acad Sci USA 73:208-212.

Mullins FH, Hargreaves AJ, Li JY, Dahlström A, McLean WG. 1994. Tyrosination state of alpha-tubulin in regenerating peripheral nerve. J Neurochem 62:227-234.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 51:263-273.

Nash RE, Puvion E, Bernhard W. 1975. Perichromatin fibrils as components of rapidly labeled extranucleolar RNA. J Ultrastruct Res 53:395-405.

Navascués J, Berciano MT, Tücker KE, Lafarga M, Matera AG. 2004a. Targeting SMN to Cajal bodies and nuclear gems during neuritogenesis. Chromosoma 112:398-409.

Navascués J, Casafont I, Villagra NT, Lafarga M, Berciano MT. 2004b. Reorganization of nuclear compartments of type A neurons of trigeminal ganglia in response to inflammatory injury of peripheral nerve endings. J Neurocytol 33:393-405.

Navascués J, Bengoechea R, Tapia O, Casafont I, Berciano MT, Lafarga M. 2008. SUMO-1 transiently localizes to Cajal bodies in mammalian neurons. J Struct Biol 163:137-146.

Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. 2001. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. Mol Cell 7:729-739.

Nunzi MG, Birnstiel S, Bhattacharyya BJ, Slater NT, Mugnaini E. 2001. Unipolar brush cells form a glutamatergic projection system within the mouse cerebellar cortex. J Comp Neurol 434:329-341.

O'Gorman S. 1985. Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. II. Cytology of neuron loss. J Comp Neurol 234:298-316.

O'Gorman S, Sidman RL. 1985. Degeneration of thalamic neurons in "Purkinje cell degeneration" mutant mice. I. Distribution of neuron loss. J Comp Neurol 234:277-297.

O'Hearn E, Molliver ME. 1993. Degeneration of Purkinje cells in parasagittal zones of the cerebellar vermis after treatment with ibogaine or harmaline. Neuroscience 55:303-310.

Ohsugi K, Adachi K, Ando K. 1986. Serotonin metabolism in the CNS in cerebellar ataxic mice. Experientia 42:1245-1247.

Olson MO, Dundr M. 2005. The moving parts of the nucleolus. Histochem Cell Biol 123:203-216.

Olson MO, Hingorani K, Szebeni A. 2002. Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. Int Rev Cytol 219:199-266.

Päällysaho J, Sugita S, Noda H. 1990. Cerebellar corticonuclear and nucleocortical projections in the vermis of posterior lobe of the rat as studied with anterograde and retrograde transport of WGA-HRP. Neurosci Res 8:158-178.

Palay SL, Chan-Palay V. 1974. Cerebellar cortex: cytology and organization. Springer-Verlag. Berlín.

Pardo B, Gómez-González B, Aguilera A. 2009. DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. Cell Mol Life Sci 66:1039-1056.

Paturle L, Wehland J, Margolis RL, Job D. 1989. Complete separation of tyrosinated, detyrosinated, and non-tyrosinatable brain tubulin subpopulations using affinity chromatography. Biochemistry 28:2698-2704.

Paturle-Lafanechère L, Manier M, Trigault N, Pirollet F, Mazarguil H, Job D. 1994. Accumulation of delta 2-tubulin, a major tubulin variant that cannot be tyrosinated, in neuronal tissues and in stable microtubule assemblies. J Cell Sci 107:1529-1543.

Paulson HL, Miller VM. 2005. Breaks in coordination: DNA repair in inherited ataxia. Neuron 46:845-848.

Pekny M, Nilsson M. 2005. Astrocyte activation and reactive gliosis. Glia 50:427-434.

Pellionisz A, Szentágothai J. 1973. Dynamic single unit simulation of a realistic cerebellar network model. Brain Res 49:83-99.

Pena E, Berciano MT, Fernández R, Crespo P, Lafarga M. 2000. Stress-induced activation of c-Jun N-terminal kinase in sensory ganglion neurons: accumulation in nuclear domains enriched in splicing factors and distribution in perichromatin fibrils. Exp Cell Res 256:179-191.

Pena E, Berciano MT, Fernández R, Ojeda JL, Lafarga M. 2001. Neuronal body size correlates with the number of nucleoli and Cajal bodies, and with the organization of the splicing machinery in rat trigeminal ganglion neurons. J Comp Neurol 430:250-263.

Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Pérez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. Mol Cell 12:1577-1589.

Petrini JH, Stracker TH. 2003. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. Trends Cell Biol 13:458-462.

Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29:45.

Proudfoot N. 2000. Connecting transcription to messenger RNA processing. Trends Biochem Sci 25:290-293.

Proudfoot NJ, Furger A, Dye MJ. 2002. Integrating mRNA processing with transcription. Cell 108:501-512.

Pryde F, Khalili S, Robertson K, Selfridge J, Ritchie AM, Melton DW, Jullien D, Adachi Y. 2005. 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. J Cell Sci 118:2043-2055.

Puvion-Dutilleul F, Mazan S, Nicoloso M, Pichard E, Bachellerie JP, Puvion E. 1992. Alterations of nucleolar ultrastructure and ribosome biogenesis by actinomycin D. Implications for U3 snRNP function. Eur J Cell Biol 58:149-162.

Ramón y Cajal S. 1911. Histologie du système nerveux de l'homme et des vértebrés, I. Maloine, París.

Ransom B, Behar T, Nedergaard M. 2003. New roles for astrocytes (stars at last). Trends Neurosci 26:520-522.

Raska I. 2003. Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. Trends Cell Biol 13:517-525.

Raska I, Ochs RL, Andrade LE, Chan EK, Burlingame R, Peebles C, Gruol D, Tan EM. 1990. J Struct Biol 104:120-127.

Raska I, Koberna K, Malínský J, Fidlerová H, Masata M. 2004. The nucleolus and transcription of ribosomal genes. Biol Cell 96:579-594.

Recio JS. 2008. Trasplante de médula ósea e identificación de sus derivados neurales en un modelo animal con neurodegeneración selectiva, el ratón mutante PCD. Aproximación a la terapia regenerativa con células madre adultas. Tesis Doctoral. Universidad de Salamanca.

Recio JS, Weruaga E, Gómez C, Valero J, Briñón JG, Alonso JR. 2007. Changes in the connections of the main olfactory bulb after mitral cell selective neurodegeneration. J Neurosci Res 85:2407-2421.

Reichmann G, Schroeter M, Jander S, Fischer HG. 2002. Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. J Neuroimmunol 129:125-132.

Reimer G, Pollard KM, Penning CA, Ochs RL, Lischwe MA, Busch H, Tan EM. 1987. Monoclonal autoantibody from a (New Zealand black x New Zealand white) F1 mouse and some human scleroderma sera target an Mr 34,000 nucleolar protein of the U3 RNP particle. Arthritis Rheum 30:793-800.

Riballo E, Kühne M, Rief N, Doherty A, Smith GC, Recio MJ, Reis C, Dahm K, Fricke A, Krempler A, Parker AR, Jackson SP, Gennery A, Jeggo PA, Löbrich M. 2004. A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. Mol Cell 16:715-724.

Rice JC, Briggs SD, Ueberheide B, Barber CM, Shabanowitz J, Hunt DF, Shinkai Y, Allis CD. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. Mol Cell 12:1591-1598.

Rodríguez de la Vega, Sevilla RG, Hermoso A, Lorenzo J, Tanco S, Diez A, Fricker LD, Bautista JM, Avilés FX. 2007. Nna1-like proteins are active metallocarboxypeptidases of a new and diverse M14 subfamily. FASEB J 21:851-865.

Rolig RL, McKinnon PJ. 2000. Linking DNA damage and neurodegeneration. Trends Neurosci 23:417-424.

Roth AD, Ramírez G, Alarcón R, Von Bernhardi R. 2005. Oligodendrocytes damage in Alzheimer's disease: beta amyloid toxicity and inflammation. Biol Res 38:381-387.

Sacco-Bubulya P, Spector DL. 2002. Disassembly of interchromatin granule clusters alters the coordination of transcription and pre-mRNA splicing. J Cell Biol 156:425-436.

Samples RM, Ward-Bailey PF, Donahue LR, Bronson RT, Davisson MT. 2005. Purkinje Cell Degeneration 7 Jackson, a Remutation of the *Agtbpb1* Gene. MGI Direct Data.

Sarg B, Helliger W, Talasz H, Koutzamani E, Lindner HH. 2004. Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. J Biol Chem 279:53458-53464.

Sarna JR, Larouche M, Marzban H, Sillitoe RV, Rancourt DE, Hawkes R. 2003. Patterned Purkinje cell degeneration in mouse models of Niemann-Pick type C disease. J Comp Neurol 456:279-291.

Schnapp BJ, Vale RD, Sheetz MP, Reese TS. 1985. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. Cell 40:455-462.

Schotta G, Lachner M, Sarma K, Ebert A, Sengupta R, Reuter G, Reinberg D, Jenuwein T. 2004. A silencing pathway to induce H3-K9 and H4-K20 trimethylation at constitutive heterochromatin. Genes Dev 18:1251-1262.

Seki T, Takahashi H, Adachi N, Abe N, Shimahara T, Saito N, Sakai N. 2007. Aggregate formation of mutant protein kinase C gamma found in spinocerebellar ataxia type 14 impairs ubiquitin-proteasome system and induces endoplasmic reticulum stress. Eur J Neurosci 26:3126-3140.

Sgaier SK, Millet S, Villanueva MP, Berenshteyn F, Song C, Joyner AL. 2005. Morphogenetic and cellular movements that shape the mouse cerebellum; insights from genetic fate mapping. Neuron 45:27-40.

Shiloh Y. 2003a. ATM: ready, set, go. Cell Cycle 2:116-117.

Shiloh Y. 2003b. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. Nat Rev Cancer 3:155-168.

Shojaeian H, Delhaye-Bouchaud N, Mariani J. 1988. Stability of inferior olivary neurons in rodents. I. Moderate cell loss in adult Purkinje cell degeneration mutant mouse. Brain Res 466:211-218.

Shringarpure R, Grune T, Davies KJ. 2001. Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. Cell Mol Life Sci 58:1442-1450.

Sidman RL, Appel SH, Fullier JF. 1965. Neurological Mutants of the Mouse. Science 150:513-516.

Sillitoe RV, Joyner AL. 2007. Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum. Annu Rev Cell Dev Biol 23:549-577.

Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernández-Verdún D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. Histochem Cell Biol 129:13-31.

Sotelo C. 1975. Anatomical, physiological and biochemical studies of the cerebellum from mutant mice. II. Morphological study of cerebellar cortical neurons and circuits in the *weaver* mouse. Brain Res 94:19-44.

Sotelo C. 2004. Cellular and genetic regulation of the development of the cerebellar system. Prog Neurobiol 72:295-339.

Spector DL. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. Annu Rev Cell Biol 9:265-315.

Spector DL. 2001. Nuclear domains. J Cell Sci 114:2891-2893.

Spector DL, Schrier WH, Busch H. 1983. Immunoelectron microscopic localization of snRNPs. Biol Cell 49:1-10.

Spector DL, Fu XD, Maniatis T. 1991. Associations between distinct pre-mRNA splicing components and the cell nucleus. EMBO J 10:3467-3481.

Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu Rev Cell Dev Biol 17:463-516.

Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Löbrich M, Jeggo PA. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. Cancer Res 64:2390-2396.

Stolzing A, Grune T. 2004. Neuronal apoptotic bodies: phagocytosis and degradation by primary microglial cells. FASEB J 18:743-745.

Strahlendorf JC, Hubbard GD. 1983. Serotonergic interactions with rat cerebellar Purkinje cells. Brain Res Bull 11:265-269.

Streit WJ. 2002. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. Glia 40:133-139.

Strouboulis J, Wolffe AP. 1996. Functional compartmentalization of the nucleus. J Cell Sci 109:1991-2000.

Sugihara I, Wu H, Shinoda Y. 1999. Morphology of single olivocerebellar axons labeled with biotinylated dextran amine in the rat. J Comp Neurol 414:131-148.

Sun H, Treco D, Szostak JW. 1991. Extensive 3'-overhanging, single-stranded DNA associated with the meiosis-specific double-strand breaks at the ARG4 recombination initiation site. Cell 64:1155-1161.

Swensen AM, Bean BP. 2003. Ionic mechanisms of burst firing in dissociated Purkinje neurons. J Neurosci 23:9650-9663.

Tacconi MT. 1998. Neuronal death: is there a role for astrocytes? Neurochem Res 23:759-765.

Takeda K, Takeuchi O, Akira S. 2002. Recognition of lipopeptides by Toll-like receptors. J Endotoxin Res 8:459-463.

Tan J, Gerrits NM, Nanhoe R, Simpson JI, Voogd J. 1995. Zonal organization of the climbing fiber projection to the flocculus and nodulus of the rabbit: a combined axonal tracing and acetylcholinesterase histochemical study. J Comp Neurol 356:23-50.

Taylor AM, Groom A, Byrd PJ. 2004. Ataxia-telangiectasia-like disorder (ATLD)-its clinical presentation and molecular basis. DNA Repair 3:1219-1225.

Tolbert DL, Ewald M, Gutting J, La Regina MC. 1994. Spatial and temporal pattern of Purkinje cell degeneration in shaker mutant rats with hereditary cerebellar ataxia. J Comp Neurol 355:490-507.

Thiry M. 1995. Behavior of interchromatin granules during the cell cycle. Eur J Cell Biol 68:14-24.

Triarhou LC, Ghetti B. 1991. Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged 'Purkinje cell degeneration' mutant mice. Acta Neuropathol 81:597-602.

Triarhou LC, Norton J, Ghetti B. 1987. Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice. Exp Brain Res 66:577-588.

Tücker KE, Berciano MT, Jacobs EY, LePage DF, Shpargel KB, Rossire JJ, Chan EK, Lafarga M, Conlon RA, Matera AG. 2001. Residual Cajal bodies in coilin knockout mice fail to recruit Sm snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy gene product. J Cell Biol 154:293-307.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. Proc Natl Acad Sci USA 98:5116-5121.

Ullrich O, Diestel A, Eyupoglu IY, Nitsch R. 2001. Regulation of microglial expression of integrins by poly (ADP-ribose) polymerase-1. Nat Cell Biol 3:1035-1042.

Urushitani M, Kurisu J, Tsukita K, Takahashi R. 2002. Proteasomal inhibition by misfolded mutant superoxide dismutase 1 induces selective motor neuron death in familial amyotrophic lateral sclerosis. J Neurochem 83:1030-1042.

Valero J. 2006. Degeneración de las células mitrales y sus efectos en la neurogénesis adulta del bulbo olfatorio del ratón mutante *pcd*. Trabajo de Grado de la Universidad de Salamanca.

Valero J, Berciano MT, Weruaga E, Lafarga M, Alonso JR. 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 33:283-295.

van den Bosch M, Bree RT, Lowndes NF. 2003. The MRN complex: coordinating and mediating the response to broken chromosomes. EMBO Rep 4:844-849.

van Gent DC, van der Burg M. 2007. Non-homologous end-joining, a sticky affair. Oncogene 26:7731-7740.

van Rossum D, Hanisch UK. 2004. Microglia. Metab Brain Dis 19:393-411.

Vicente S, Pérez-Rodríguez R, Oliván AM, Martínez Palacián A, González MP, Oset-Gasque MJ. 2006. Nitric oxide and peroxynitrite induce cellular death in bovine chromaffin cells: evidence for a mixed necrotic and apoptotic mechanism with caspases activation. J Neurosci Res 84:78-96.

Villagra NT, Berciano J, Altable M, Navascués J, Casafont I, Lafarga M, Berciano MT. 2004. PML bodies in reactive sensory ganglion neurons of the Guillain-Barré syndrome. Neurobiol Dis 16:158-168.

Viviani P, Du X, Beutler B. 2008. Mutagenetix URL: http://mutagenetix.scripps.edu, The Scripps Research Institute, La Jolla CA, Drunk is an allele of *Agtphp1* causing Purkinje cell and retinal degeneration and male sterility. MGI Direct Data.

Voogd J, Glickstein M. 1998. The anatomy of the cerebellum. Trends Neurosci 21:370-375.

Voogd J, Ruigrok TJ. 1997. Transverse and longitudinal patterns in the mammalian cerebellum. Prog Brain Res 114:21-37.

Voogd J, Gerrits NM, Marani E. 1985. Cerebellum. En: *The rat nervous system* (Paxinos G., ed.), pp. 251-291. Academic Press, Orlando.

Wagstaff MJ, Collaço-Moraes Y, Smith J, de Belleroche JS, Coffin RS, Latchman DS. 1999. Protection of neuronal cells from apoptosis by Hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. J Biol Chem 274:5061-5069.

Wang T, Morgan JI. 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, Morgan JI. 2006. The carboxypeptidase-like substrate-binding site in Nna1 is essential for the rescue of the Purkinje cell degeneration (pcd) phenotype. Mol Cell Neurosci 33:200-213.

Wang VY, Zoghbi HY. 2001. Genetic regulation of cerebellar development. Nat Rev Neurosci 2:484-491.

Ward IM, Chen J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. J Biol Chem 276:47759-47762.

Wassef M, Simons J, Tappaz ML, 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 399:125-135.

Wassef M, Sotelo C, Cholley B, Brehier A, Thomasset M. 1987. Cerebellar mutations affecting the postnatal survival of Purkinje cells in the mouse disclose a longitudinal pattern of differentially sensitive cells. Dev Biol 124:379-389.

Webster DR, Modesti NM, Bulinski JC. 1992. Regulation of cytoplasmic tubulin carboxypeptidase activity during neural and muscle differentiation: characterization using a microtubule-based assay. Biochemistry 31:5849-5856.

Weiss GM, Pysh JJ. 1978. Evidence for loss of Purkinje cell dendrites during late development: a morphometric Golgi analysis in the mouse. Brain Res 154:219-230.

Welker WI. 1990. The significance of foliation and fissuration of cerebellar cortex. The cerebellar folium as a fundamental unit of sensorimotor integration. Arch Ital Biol 128:87-109.

Welsh JP, Yuen G, Placantonakis DG, Vu TQ, Haiss F, O'Hearn E, Molliver ME, Aicher SA. 2002. Why do Purkinje cells die so easily after global brain ischemia? Aldolase C, EAAT4, and the cerebellar contribution to posthypoxic myoclonus. Adv Neurol 89:331-359.

Weruaga-Prieto E, Eggli P, Celio MR. 1996. Rat brain oligodendrocytes do not interact selectively with axons expressing different calcium-binding proteins. Glia 16:117-128.

Westermann S, Weber K. 2003. Post-translational modifications regulate microtubule function. Nat Rev Mol Cell Biol 4:938-947.

Wilson TE, Grawunder U, Lieber MR. 1997. Yeast DNA ligase IV mediates non-homologous DNA end joining. Nature 388:495-498.

Wingate RJ. 2001. The rhombic lip and early cerebellar development. Curr Opin Neurobiol 11:82-88.

Wingate RJ, Hatten ME. 1999. The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. Development 126:4395-4404.

Womack M, Khodakhah K. 2002. Active contribution of dendrites to the tonic and trimodal patterns of activity in cerebellar Purkinje neurons. J Neurosci 22:10603-10612.

Wyss-Coray T, Mucke L. 2002. Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. Neuron 35:419-432.

Xiao R, Park Y, Dirisala VR, Zhang YP, Um SJ, Lee HT, Park C. 2005. Identification of genes differentially expressed in wild type and Purkinje cell degeneration mice. Mol Cells 20:219-227.

Yamada KM, Spooner BS, Wessells NK. 1970. Axon growth: roles of microfilaments and microtubules. Proc Natl Acad Sci USA 66:1206-1212.

Yamada M, Sato T, Shimohata T, Hayashi S, Igarashi S, Tsuji S, Takahashi H. 2001. Interaction between neuronal intranuclear inclusions and promyelocytic leukemia protein nuclear and coiled bodies in CAG repeat diseases. Am J Pathol 159:1785-1795.

Yamanaka K, Chun SJ, Boillee S, Fujimori-Tonou N, Yamashita H, Gutmann DH, Takahashi R, Misawa H, Cleveland DW. 2008. Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. Nat Neurosci 11:251-253.

Zeng HY, Zhu XA, Zhang C, Yang LP, Wu LM, Tso MO. 2005. Identification of sequential events and factors associated with microglial activation, migration, and cytotoxicity in retinal degeneration in rd mice. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:2992-2999.

Zhang C, Shen JK, Lam TT, Zeng HY, Chiang SK, Yang F, Tso MO. 2005. Activation of microglia and chemokines in light-induced retinal degeneration. Mol Vis 11:887-895.

Zhang W, Ghetti B, Lee WH. 1997. Decreased IGF-I gene expression during the apoptosis of Purkinje cells in pcd mice. Dev Brain Res 98:164-176.