

**Universidad de Extremadura**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio sobre la regionalización del sistema *Cb5R/Cb5*  
en el cerebro adulto de rata y alteraciones en  
procesos neurodegenerativos**

**Virginio García López**

**Departamento de Enfermería**

**2016**

Conformidad de los Directores:

Dr. C. Gutiérrez Merino

Dr. J.D. Pedrera Zamorano

Dr. F.M. Sánchez Margallo

Esta investigación ha sido financiada con Proyectos del

**Ministerio de Economía y Competitividad** “Programa Estatal de Investigación Científica y Técnica de Excelencia”:

Investigador Principal: **Dr. Carlos Gutiérrez Merino**

Proyectos: **BFU2011-30178**

**BFU2014-53641**

y de la **Consejería de Economía, Competitividad e Innovación**, de la Junta de Extremadura, cofinanciadas por **FSE y FEDER**:

Investigador Principal: **Dr. Carlos Gutiérrez Merino**

Proyectos: **GR10092**

**GR15139**

Investigador Principal: **Dr. Juan Diego Pedrera Zamorano**

Proyectos: **GR10170**

**GR15144**

Investigador Principal: **Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo**

Proyectos: **GR10181**

**GR15175**



*Warning:  
Insufficient Medical Research  
Can Be Hazardous To Your Health*

*A mis padres*

## AGRADECIMIENTOS

A mis Directores de Tesis, los Doctores Gutiérrez Merino, Pedrera Zamorano y Sánchez Margallo, por su disponibilidad, apoyo, implicación y confianza.

Al Profesor Jesús Usón Gargallo, Presidente de Honor del CCMIJU, me gustaría darle las gracias de una manera especial, por su apoyo tanto a nivel personal como profesional, todos los días cuando comenzamos la jornada a las 7:30h de la mañana, es el primero que viene a la farmacia y me regala unas palabras de motivación y consejos, despertando en mi una gran ilusión haciendo así, que disfrute mucho más trabajando.

Por si no fuera suficiente la deuda de gratitud que con él tengo contraída, me ha distinguido al acompañarme en este trabajo, y me honra cada día con su trato personal y afecto. Gracias, de corazón, por ser un verdadero **maestro**.

A la Profesora Carmen López Sánchez, que ha seguido de cerca el desarrollo de la presente tesis, quisiera agradecerle su apoyo, disponibilidad y constante colaboración en este trabajo.

Al Profesor Ignacio Santiago Álvarez Miguel, por haberme abierto las puertas de su laboratorio, permitiéndome dar mis primeros pasos en la investigación, depositando en mi toda su confianza.

Al Profesor Virginio García Martínez, por ser el principal responsable de que este trabajo hoy vea la luz, estando siempre a mi lado, motivándome y animándome a continuar. Por todo eso y mucho más este trabajo también le pertenece. “No tendría folios para escribirle todo lo que tengo que agradecerle.”

A la Profesora M<sup>a</sup> Ángeles Holgado Villafuerte, por creer en mi y brindarme su apoyo incondicional en los momentos difíciles.

Agradecer, especialmente a mis padres, por su eterna entrega, dedicación, apoyo en todos los momentos, guiarme en mi camino y motivándome a seguir adelante. Sin ellos nada hubiera sido posible.

Tampoco puedo dejar de agradecer a toda mi familia, fuente de apoyo constante e incondicional.

A mis amigos más queridos, Jaime, Patricio, Adolfo, Carlos, Francisco y Manuel, por estar a mi lado siempre compartiendo los mejores momentos y ayudándome en las situaciones difíciles.

A mis compañeros y amigos del Centro de Cirugía de Mínima Invasión “*Jesús Usón*”, gracias por su ayuda y colaboración.

A todas las personas que, aunque no aparecen aquí con nombres y apellidos, han estado presentes de alguna forma durante el desarrollo de este trabajo.

**RESUMEN**

En la presente Tesis doctoral describimos un estudio detallado de la distribución del complejo enzimático redox citocromo  $b_5$  reductasa ( $Cb_5R$ ) / citocromo  $b_5$  ( $Cb_5$ ). Este sistema juega un papel crucial en la funcionalidad de numerosas células de mamíferos. Se ha propuesto en los últimos años que este sistema estaría implicado en el reciclaje del ascorbato, una molécula vital antioxidante del cerebro, cuya desregulación puede dar lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno, cuya actuación es determinante en el proceso de muerte neuronal inducida por estrés oxidativo. Hemos llevado a cabo un estudio regional y celular de la expresión de este sistema redox en cerebro de rata adulta, utilizando, entre otros, anticuerpos frente a  $Cb_5R$  y frente a  $Cb_5$ . Nuestros resultados han puesto de manifiesto la expresión de altos niveles de este sistema en la corteza cerebelosa, marcando de forma preferente las células de la capa granulosa y las células de Purkinje. De modo similar, hemos demostrado su distribución a nivel de los núcleos del cerebelo: fastigial, interpuesto y dentado. Una amplia región especial de  $Cb_5R$  en la corteza cerebelosa ha sido observada en cercana relación con los *rafts* lipídicos, marcados con toxina B, tal como hemos puesto en evidencia mediante imagen de transferencia de energía con fluorescencia. Adicionalmente, a nivel de los núcleos del tronco del encéfalo y de las áreas motoras de la corteza cerebral, así como en el hipocampo, este sistema  $Cb_5R/Cb_5$  ha sido observado mostrando elevados niveles de expresión.

Todos estos datos apoyan la hipótesis de un relevante papel del sistema  $Cb_5R/Cb_5$  en la función cerebral, hasta tal punto que diversas alteraciones neurológicas, tal como la metahemoglobinemia congénita tipo II, podrían ser causadas por déficits en este sistema redox. Del mismo modo, patologías neurodegenerativas que ocurren en diversas áreas encefálicas podrían tener su origen en alteraciones del sistema.

Finalmente, nuestros resultados obtenidos de estudios de lesión experimental con ácido nitropropiónico, y su prevención mediante la administración del flavonoide antioxidante kaempferol, apoyan el papel crucial del sistema  $Cb_5R/Cb_5$  en las patologías neurodegenerativas, y su posible tratamiento y prevención mediante la administración de antioxidantes naturales.

## **SUMMARY**

Cytochrome *b*<sub>5</sub> reductase (*Cb*<sub>5</sub>R) and cytochrome *b*<sub>5</sub> (*Cb*<sub>5</sub>) form an enzymatic redox system that plays many roles in mammalian cells. In the last 15 years, it has been proposed that this system is involved in the recycling of ascorbate, a vital antioxidant molecule in the brain and that its deregulation can lead to the production of reactive oxygen species that play a major role in oxidative-induced neuronal death. In this work, we have performed a regional and cellular distribution study of the expression of this redox system in adult rat brain by anti-*Cb*<sub>5</sub>R isoform 3 and anti-*Cb*<sub>5</sub> antibodies. We found high expression levels in cerebellar cortex, labeling heavily granule neurons and Purkinje cells, and in structures such as the fastigial, interposed and dentate cerebellar nuclei. A large part of *Cb*<sub>5</sub>R isoform 3 in the cerebellum cortex was regionalized in close proximity to the lipid raft-like nanodomains, labelled with cholera toxin B, as we have shown by fluorescence resonance energy transfer imaging. In addition, vestibular, reticular and motor nuclei located at the brain stem level and pyramidal neurons of somatomotor areas of the brain cortex and of the hippocampus have been also found to display high expression levels of these proteins.

All these results point out the enrichment of *Cb*<sub>5</sub>R isoform 3/*Cb*<sub>5</sub> system in neuronal cells and structures of the cerebellum and brain stem whose functional impairment can account for neurological deficits reported in type II congenital methemoglobinemia, as well as in brain areas highly prone to undergo oxidative stress-induced neurodegeneration.

Finally, we have demonstrated the protective effect of kaempferol in neurodegeneration induced by 3-nitropropionic acid, which is responsible of the architectural alteration of the redox system *Cb*<sub>5</sub>R/*Cb*<sub>5</sub>.

## ÍNDICE



● Introducción	5
● Objetivos	11
● Estado actual del tema	15
● Material y Métodos	33
● Resultados	49
● Discusión	79
● Conclusiones	85
● Bibliografía	89
● Documento de Actividades	100



## **INTRODUCCIÓN**



El sistema enzimático redox citocromo  $b_5$  reductasa/citocromo  $b_5$  juega un papel pleiotrópico en la biología celular, del que dependen importantes funciones celulares que incluyen: biosíntesis de ácidos grasos saturados (Jeffcoat et al., 1977; Rioux et al., 2011), regulación de la biosíntesis del colesterol (Kawata et al. 1985), la modulación de las isoformas del citocromo P450, implicadas en la biosíntesis de las hormonas esteroideas y la detoxificación xenobiótica (Hildebrandt y Estabrook 1971; Schenkman y Jansson 2003) y en la reducción/reciclaje de la metahemoglobina (Hultquist y Passon 1971; Leroux et al. 1975; Vieira et al., 1995). Además,  $Cb_5R$  es un componente de la cadena redox de la membrana plasmática (Villalba et al., 1997; May 1999; Samhan-Arias et al., 2008). Este sistema ha sido también implicado en el reciclaje de los radicales libres de ascorbato a ascorbato (May 1999; Samhan-Arias et al., 2008; Harrison y May 2009), una de las mayores defensas antioxidantes del cerebro.

En los últimos años se han descrito en humanos más de cuarenta mutaciones espontáneas de  $Cb_5R$ , de las cuales más del 50% dan lugar a la metahemoglobinemia tipo II congénita recesiva, una enfermedad hereditaria que cursa con cianosis moderada acompañada de grave deterioro neurológico y menor esperanza de vida (Percy y Lappin 2008; Ewencyk et al., 2008; Huang et al., 2012). Clínicamente, esta rara enfermedad, se manifiesta por retraso en el desarrollo, microcefalia, distonía generalizada y trastornos de movimiento, consecuente a la atrofia cortical y subcortical que afecta al cerebro y al cerebelo (Leroux et al., 1975; Aalfs et al., 2000; Toelle et al., 2004; Percy y Lappin 2008; Ewencyk et al., 2008; Huang et al., 2012).

Estudios realizados en neuronas corticales cerebelosas en cultivo -sobre las que se han inducido procesos de apoptosis en las neuronas granulares mediante disminución de los niveles de  $K^+$  en el medio extracelular- han establecido un excelente modelo para analizar experimentalmente los procesos de muerte neuronal que acontecen durante el desarrollo del cerebro (Contestabile 2002). De modo interesante, este modelo de apoptosis neuronal ha sido también de gran utilidad para el desarrollo de modelos de estudios basados en análisis moleculares que revelan la relación existente entre la

apoptosis neuronal y la enfermedad neurodegenerativa tan importante como es la enfermedad de Alzheimer (Canu y Calissano 2003). La desregulación de la cadena redox de la membrana plasmática puede dar origen a una elevación del anión superóxido, un paso inicial precoz que tiene lugar en la apoptosis de las células granulares del cerebelo experimentalmente inducidas por bajos niveles de  $K^+$ , y además constituye un factor crítico para el avance del proceso apoptótico hacia una fase irreversible caracterizada por la activación de las caspasas (Valencia y Moran 2001; Martin-Romero et al., 2002; Samhan-Arias et al., 2004). En estudios previos, se ha puesto de manifiesto que la estimulación de  $Cb_5R$  asociado con la membrana plasmática de las neuronas granulares del cerebelo pueden actuar sobre las elevaciones de anión superóxido producidas antes de la entrada en la fase irreversible de apoptosis de estas neuronas (Samhan-Arias et al., 2009).

Recientemente, se ha puesto de manifiesto que la producción de anión superóxido asociado a la actividad oxidasa NADH de  $Cb_5R$  purificado está inhibida por apocinina (Samhan-Arias y Gutierrez-Merino 2014a), un compuesto que ha sido ampliamente utilizado como un inhibidor selectivo de la producción de anión superóxido por las oxidasas NADPH de la membrana plasmática en diferentes líneas celulares de mamíferos (Crane et al., 1994). Es de especial interés destacar que cuando las neuronas granulares de cerebelo en cultivo son inducidas hacia un proceso apoptótico mediante la disminución de  $Ca^{2+}$  en el medio extracelular tiene lugar un incremento de los niveles de  $Cb_5$  entre dos y tres veces su nivel normal dentro de las dos primeras horas del experimento, un incremento que tiene lugar de modo paralelo a la estimulación de la producción del anión superóxido por el  $Cb_5R$  asociado a la membrana plasmática (Samhan-Arias et al., 2012).

Un grupo de experimentos en esta línea, también desarrollados sobre células granulares in-vitro, han puesto de manifiesto que la isoforma 3- $Cb_5R$  (o DIA1) está ampliamente unida a nanodominios de la membrana plasmática asociados a rafts lipídicos (Samhan-Arias et al., 2009; Marques-da-Silva et al., 2010; Marques-da Silva y Gutierrez-Merino 2014). Además, el bloqueo de la actividad de la NADH oxidasa de la membrana plasmática en estas neuronas

está asociado con la inhibición de la producción del anión superóxido mediante la administración del flavonoide kaempferol, el cual también proporciona una gran protección frente a la generación del estrés oxidativo y la muerte neuronal de las neuronas granulares del cerebelo sometidas a un proceso proapoptótico inducido por bajos niveles de  $K^+$  del medio extracelular (Samhan-Arias et al., 2004).

En otros modelos experimentales diferentes, ha sido demostrado que la administración de kaempferol proporciona una importante protección frente a la neurodegeneración cerebral inducida, tanto por isquemia-reperfusión tras la oclusión temporal de la arteria cerebral media (López-Sánchez et al., 2007), como por tras la administración de ácido 3-nitropropiónico, una neurotoxina que permite reproducir un modelo animal de enfermedad de Huntington (Lagoa et al., 2009).

Todos estos datos en conjunto ponen de manifiesto que el sistema isoforma 3- $Cb_5R/Cb_5$  está adquiriendo un papel emergente importante reciente como una nueva diana farmacológica a tener en cuenta en el daño cerebral inducido por isquemia-reperfusión, trauma, procesos neurodegenerativos y otras enfermedades relacionadas con el cerebro.

Además del relevante papel que las neuronas de la capa granular juegan en la señalización interneuronal de la corteza cerebelosa, las células de Purkinje desempeñan también un importante papel clave para la respuesta integradora y las conexiones eferentes de estas áreas del cerebelo. Se ha demostrado que la neurodegeneración de las células de Purkinje da lugar a una alteración de las funciones de control, características de numerosas alteraciones neurológicas que cursan con disfunción cerebelar, tales como paro cardíaco (Paine et al., 2012), ataxias espástica y espinocerebelar (Hourez et al., 2011; Kasumu y Bezprozvanny 2012; Girard et al., 2012), enfermedad de Niemann-Pick tipo C (Elrick et al., 2010), enfermedad de Huntington (Dougherty et al., 2012) y neurotoxicidad fetal por etanol (Dikranian et al., 2005).

Ante todo lo anteriormente expuesto, en la presente tesis doctoral nos planteamos realizar un detallado estudio de la distribución regional y celular de la isoforma 3-*Cb<sub>5</sub>R/Cb<sub>5</sub>* en el encéfalo de rata adulta, incluyendo sus tres sectores: cerebro, cerebelo y tronco del encéfalo, prestando especial atención a la identificación de los tipos neuronales y estructuras que son más sensibles a los procesos de neurodegeneración inducidos por el estrés oxidativo generado a partir de la desregulación de este sistema redox.

## **OBJETIVOS**



En la presente Tesis Doctoral nos planteamos los siguientes Objetivos:

Objetivo general:

Realizar un análisis de la distribución y del papel del sistema citocromo  $b_5$  reductasa/citocromo  $b_5$  como mecanismo de defensa antioxidante y su relevancia en la evolución de enfermedades experimentalmente inducidas en encéfalo de ratas Wistar.

Objetivos específicos:

1.- Realizar un estudio detallado de la distribución y regionalización del sistema citocromo  $b_5$  reductasa/citocromo  $b_5$  en encéfalo de rata.

2.- Desarrollar modelos experimentales de patologías cerebrales que conlleven alteración del sistema citocromo  $b_5$  reductasa/citocromo  $b_5$ , mediante administración intraperitoneal de ácido nitropropiónico, agente con capacidad neurodegenerativa.

3.- Estudiar el efecto neuroprotector de la administración de kaempferol, flavonoide bioactivo natural con propiedad antioxidante, para determinar su capacidad de anular o disminuir las alteraciones del sistema citocromo  $b_5$  reductasa/citocromo  $b_5$  experimentalmente inducidas.

4.- Llevar a cabo un estudio de los alimentos y elementos que contengan compuestos bioactivos, con capacidad antioxidante, que puedan ser beneficiosos frente a diferentes patologías neuronales. Proyección y aplicabilidad del estudio en nuestra Comunidad Autónoma.

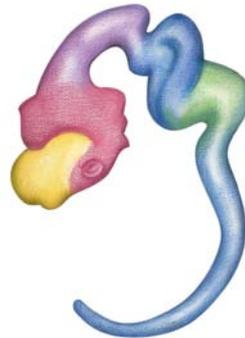


## **ESTADO ACTUAL DEL TEMA**



## **Anatomía del encéfalo**

El desarrollo del sistema nervioso (Figura 1), junto con el sistema cardiovascular, constituyen los pasos iniciales más relevantes del proceso de organogénesis de los vertebrados, puesto que ha de cubrir las necesidades específicas características de los organismos pluricelulares.



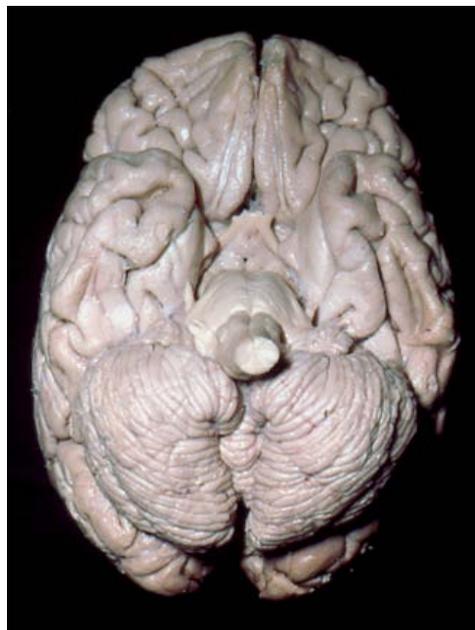
**Figura 1:** Esquema ilustrativo de los diferentes sectores que dan origen al sistema nervioso central: Telencéfalo (amarillo), Diencefalo (rosa), Mesencéfalo (púrpura), Metencéfalo (azul), Mielocéfalo (verde) y Médula espinal (azul).

El estudio del sistema nervioso central ha constituido tradicionalmente un tema muy atractivo desde cualquier punto de vista, anatómico, embriológico, fisiológico y, sobre todo patológico.

Hoy día las patologías que afectan a la médula espinal, pero sobre todo al encéfalo, son tan frecuentes que han condicionado el foco y el objetivo de numerosos grupos multidisciplinares de investigación. Además, la patología vascular, tanto o más frecuente que la patología neurológica, tiene una repercusión directa sobre ésta, ya que la vascularización del cerebro es uno de los primeros territorios afectados por la patología arteriosclerótica y, por ende, tromboembólica.

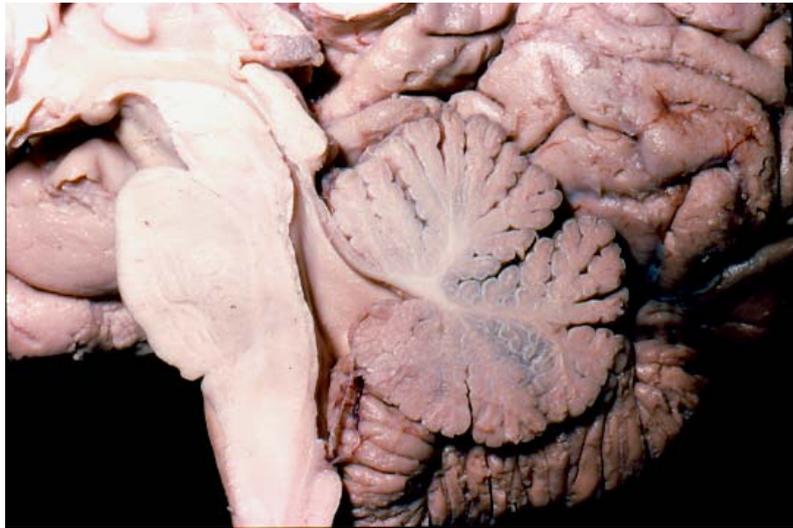
El encéfalo, constituye uno de los órganos más complejos del organismo, y desde el punto de vista anatómico se ha dividido clásicamente en tres sectores: el tronco del encéfalo, el cerebelo y el cerebro (Figura 2).

El tronco del encéfalo determina la conexión con la médula espinal. En él se localizan los núcleos que contienen los somas de neuronas motoras, sensitivas y vegetativas, así como los fascículos, constituidos por axones y dendritas que conectan las diferentes estructuras del sistema nervioso. Está constituido por tres sectores: mesencéfalo, puente o protuberancia y bulbo raquídeo, separados entre sí por el surco ponto-mesencefálico y bulbo protuberancial. Esta división se lleva a cabo atendiendo al aspecto de la superficie externa del tronco del encéfalo, dado que en su interior, estructuralmente los núcleos y los fascículos no están sujetos a este criterio. En su cara posterior se localiza el cerebelo, y entre ambos se encuentra el cuarto ventrículo, donde se aloja el líquido cefaloraquídeo, en continuación con el conducto ependimario de la médula espinal y con el tercer ventrículo, o ventrículo diencefálico, mediante el acueducto de Silvio.



**Figura 2:** Imagen fotográfica del encéfalo mostrando los diferentes sectores: Cerebro (hemisferios cerebrales y diencefalo), Cerebelo y Tronco del Encéfalo.

El cerebelo, situado dorsalmente al tronco del encéfalo, es un órgano voluminoso que ocupa la fosa craneal posterior (fosa cerebelosa) se encuentra unido al tronco del encéfalo por los pedúnculos cerebelosos, superior, medio e inferior, y macroscópicamente está constituido por el vermis y los hemisferios cerebelosos (Figura 3).



**Figura 3:** Imagen fotográfica de una sección sagital del encéfalo que interesa a los tres sectores del mismo: Cerebro, Cerebelo y Tronco del Encéfalo.

El cerebro está constituido por el diencefalo y los hemisferios cerebrales, en cuyo interior se alojan el tercer ventrículo y los ventrículos laterales, respectivamente.

El diencefalo comprende las regiones que se disponen alrededor del tercer ventrículo, y engloba al tálamo, hipotálamo, subtálamo y epitálamo.

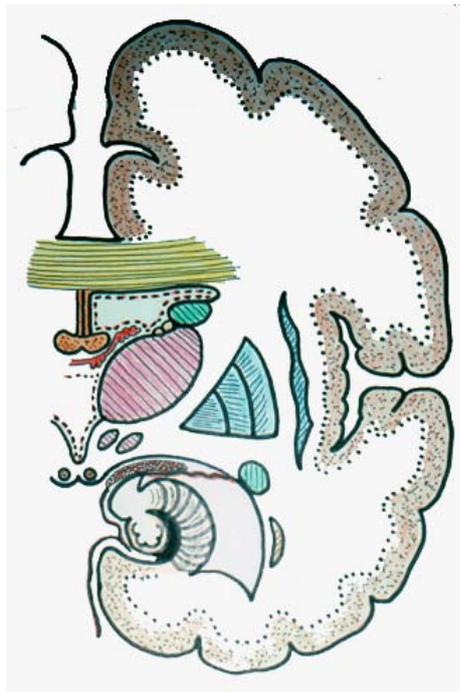
Los hemisferios cerebrales, o telencefalo, constituyen dos masas voluminosas que, ocultando al diencefalo, se disponen a cada lado de la línea media, separados entre sí por la cisura interhemisférica, y conectados entre sí, entre otras estructuras por el cuerpo calloso.

Atendiendo a la presencia de surcos y circunvoluciones, los hemisferios cerebrales se dividen en lóbulos: frontal, parietal, occipital, temporal, lóbulo límbico (que engloba al hipocampo) y el lóbulo de la ínsula.

Estructuralmente la superficie del cerebro está constituida por corteza cerebral, que engloba en su interior a la sustancia blanca, donde se encuentran inmersos los núcleos grises basales.

La corteza cerebral es un manto de sustancia gris de extraordinaria complejidad estructural que reviste la superficie de los hemisferios cerebrales y constituye el sustrato biológico de las operaciones mentales.

Los núcleos basales del cerebro se sitúan a cada lado de la línea media, diferenciándose cuatro núcleos: caudado, lenticular, subdividido en putamen y pálido, y el claustrum (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema de una sección coronal del cerebro, mostrando las estructuras diencefálicas y los núcleos grises basales de los hemisferios cerebrales: caudado, lenticular (putamen y pálido) y claustrum o antemuro, entre los cuales quedan delimitadas las cápsulas, de sustancia blanca, correspondiente a las prolongaciones neuronales de carácter aferente y eferente (cápsula blanca interna, externa y extrema).

## **Estructura de la corteza cerebral**

Dos grandes grupos de neuronas caracterizan la estructura de la corteza cerebral: las células piramidales, neuronas de axón largo que se proyectan sobre otros centros nerviosos, y un segundo grupo de neuronas, de axón corto que no abandonan la corteza cerebral, en el que se incluyen las células estrelladas espinosas, o granos, así como las células estrelladas no espinosas, las células en cesta, las células en candelabro, las células de doble ramificación dendrítica, las células horizontales de Cajal-Retzius y las células de Martinotti.

Estos elementos neuronales se disponen en láminas o capas horizontales paralelas a la superficie cortical, constituyendo de superficial a profundo seis láminas:

Lámina I, capa molecular (células horizontales de Cajal-Retzius).

Lámina II, capa granular externa (células piramidales pequeñas).

Lámina III, capa piramidal externa (células piramidales de tamaño medio).

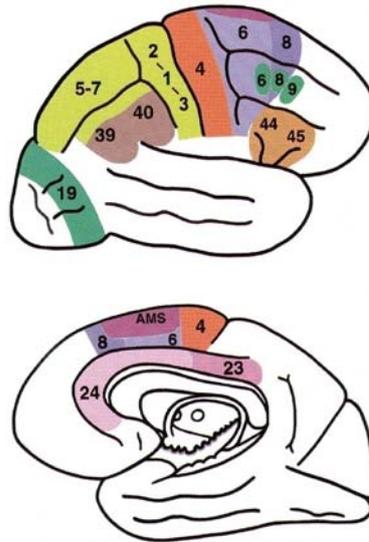
Lámina IV, capa granular interna (células estrelladas).

Lámina V, capa piramidal interna (neuronas gigantopiramidales de Betz).

Lámina VI, capa multiforme (interneuronas o neuronas de axón corto).

Atendiendo a las diferencias de espesor y estructura de láminas corticales, la superficie cortical cerebral ha sido subdividida en las áreas citoarquitectónicas de Brodmann (Figura 5).

Brodman estableció un mapa neuroanatómico de gran utilidad en el establecimiento de una correlación entre la estructura del área y una función concreta y definida. Por ejemplo el área cuatro, situada en el lóbulo frontal, motora por excelencia, es una corteza agranular que contiene las grandes neuronas gigantopiramidales de Betz.



**Figura 5:** Esquema representativo de las áreas de Brodmann.

Además de disponerse en láminas horizontales, las células de la corteza están organizadas en pequeñas unidades verticales denominadas columnas o módulos, que se extienden desde la lámina I a la lámina VI. Cada columna es una unidad operativa que conecta la información aferente y eferente de la corteza.

Especial atención merece la estructura del cerebro límbico (gran lóbulo límbico de Broca), constituido por tres anillos concéntricos, que engloban la corteza, los núcleos grises y la sustancia blanca. El segundo anillo, asociado al surco del hipocampo, contiene el complejo hipocampal, constituido por la lámina involuta (tabique de glía), el girus dentatus o cuerpo abollonado (sustancia gris cortical en la concavidad de la lámina involuta) el girus hipocampi o circunvolución hipocampal (sustancia gris cortical en la convexidad de la lámina involuta) y el albeus (sustancia blanca del complejo hipocampal). En particular, la corteza de la circunvolución hipocampal se organiza en tres capas: molecular (la más profunda), piramidal (formada por las neuronas piramidales principales del hipocampo) y estrato oriens (la más superficial, orientada hacia el ventrículo), y topográficamente está subdividido en tres áreas (lorete de Nó), denominadas campos (CA: cuerno de Ammon) CA1 (pequeña región superior o

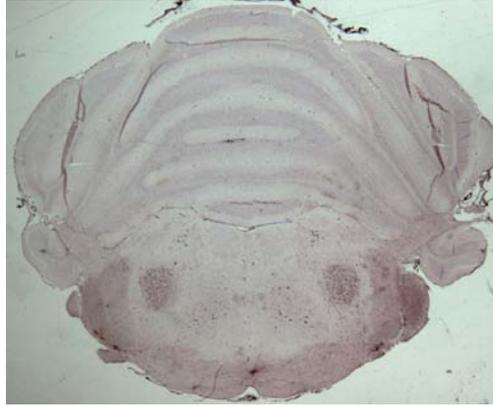
distal de Ramón y Cajal), CA2 y CA3 (grandes regiones o región inferior o proximal de Cajal). Cada uno de ellos tiene unas características arquitectónicas específicas de sus neuronas, así como una sensibilidad diferencial frente a determinados insultos, principalmente la isquemia (el campo CA1 es el más sensible). Un hecho de gran interés es la existencia en el complejo hipocámpal de una población de “células madres” que tienen capacidad neurogénica durante toda la vida.

### **Estructura del cerebelo**

Desde el punto de vista estructural (Figura 6), la superficie del cerebelo está constituida por corteza cerebelosa, que engloba en su interior a la sustancia blanca, donde se encuentran inmersos los núcleos del cerebelo.

La corteza cerebelosa, uniforme, está estructurada en tres capas. La capa más superficial es la capa molecular o plexiforme, que contiene dos tipos de neuronas: las células estrelladas, las más superficiales, y las células en cesto, las más profundas. Junto a ellas se localizan las células gliales de Bergmann y las células de Fañanás.

La capa media está formada por las células de Purkinje, que se disponen alineadas en una sola fila celular. Su prolongación dendrítica se arboriza de forma muy profusa para sinaptar con las células de la capa granular. Su axón discurre hacia el plano profundo, atraviesa la capa granular, se incorpora a la sustancia blanca y hace sinapsis con los núcleos grises del cerebelo, aunque algunos axones salen del cerebelo destinado a los núcleos vestibulares del tronco del encéfalo.



**Figura 6:** Sección frontal de un cerebelo de rata adulta mostrando las estructuras morfohistológicas más características: Corteza cerebelosa (capas granular y molecular) y sustancia blanca. Nótase la presencia de los núcleos dispersos correspondientes al tronco del encéfalo, coincidiendo a este nivel con el tránsito entre la protuberancia y el bulbo raquídeo.

La capa profunda o granular, mucho más celular, está formada por las células granulares, acompañadas por algunas células de mayor tamaño determinadas por las células de Golgi y otras neuronas de gran tamaño constituidas por las células de Lugaro y las células monodendríticas en penachos.

Además de las conexiones que se establecen entre las neuronas de la corteza cerebelosa y las fibras de proyección que se establecen a partir de los axones de las células de Purkinje (fibra de proyección de la corteza cerebelosa), se establece un grupo de fibras aferentes al cerebelo que provienen de diferentes localizaciones del sistema nervioso central: fibras trepadoras, que proceden de la oliva bulbar, fibras musgosas, que provienen de diferentes núcleos del troco del encéfalo y médula espinal, y fibras arrosariadas, multilaminares, que proceden del hipotálamo y núcleos de la protuberancia.

Los núcleos del cerebelo se sitúan a cada lado de la línea media, definiéndose cuatro núcleos: dentado, emboliforme, globoso y fastigial. En mamíferos inferiores (por ejemplo la rata) el núcleo emboliforme y el núcleo globoso están fusionados en un único núcleo: el interpuesto.

### **Neurodegeneración inducida por ácido 3-nitropropiónico**

El ácido 3-nitropropiónico (NPA) constituye un inhibidor de la succinato deshidrogenasa (SDH), enzima del ciclo de Krebs y del complejo II de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Hyllin y Matsumoto 1964; Alston et al. 1977; Huang et al. 2006). Células en cultivo tratadas con NPA han constituido un modelo clave experimental de inhibición de la respiración mitocondrial, muy utilizado en estudios *in vitro* para investigar el papel de la mitocondria en determinadas funciones celulares, tales como la homeostasis de calcio y la regulación de vías de muerte/supervivencia celular (Lee et al. 2002; Nasr et al. 2003; Rosenstock et al. 2004; Almeida et al. 2004; Centonze et al. 2006; Liot et al. 2009).

La administración sistémica de NPA a roedores y primates da lugar a perturbaciones neurológicas y degeneración del estriado (núcleos caudado y putamen), acompañadas por alteraciones neuroquímicas e histológicas similares a las observadas en la enfermedad de Huntington (HD) (Beal et al. 1993; Brouillet et al. 1995; Brouillet et al. 1999). Además, anomalías en la función mitocondrial y estrés oxidativo también han sido implicadas en HD, dato que pone de manifiesto la relevancia del modelo de degeneración estriatal inducida por NPA como modelo animal de HD (Brouillet et al. 2005; Gil y Rego 2008).

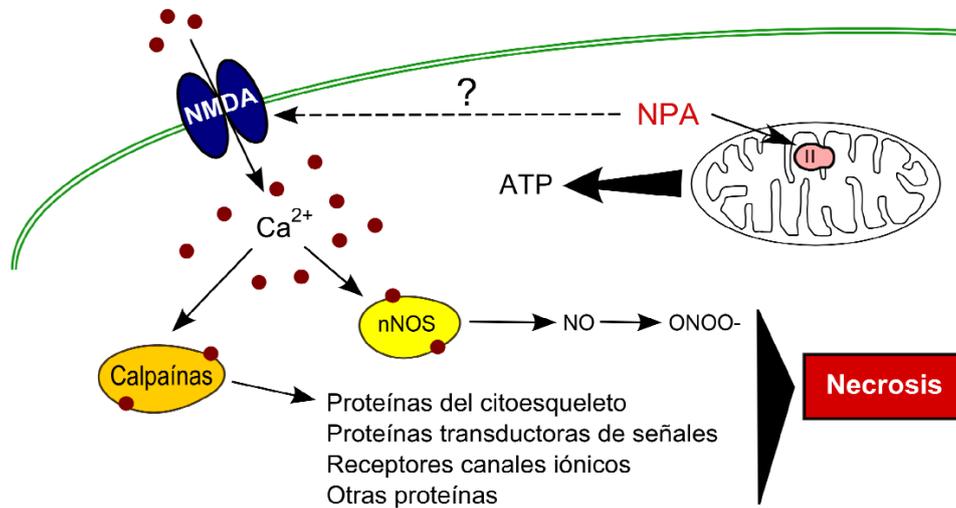
La mayor susceptibilidad de la región cerebral del estriado ante la toxicidad del NPA es aún tema de debate. No resulta de una inactivación selectiva de la SDH en aquella región cerebral, ya que el grado de inhibición de esta enzima es similar en el estriado, corteza, hipocampo y cerebelo, así como en el hígado, corazón y riñón de ratas tratadas con NPA (Brouillet et al. 1998; Mirandola et al. 2010). Previos autores estiman que la vulnerabilidad de estriado sería consecuencia de que las mitocondrias de esta región son más sensibles a la transición de permeabilidad mitocondrial inducida por NPA/Ca<sup>2+</sup> y a la mayor susceptibilidad del estriado al influjo de calcio mediado por los receptores de glutamato, o a la elevada concentración de dopamina en esta región que puede ser oxidada por ROS a quinonas citotóxicas (Mirandola et al. 2010; Herrera-Mundo y Sitges 2010).

Es bien conocido que el NPA es causa de disminución de los niveles de ATP e incremento en la producción de ROS en cultivos celulares (Lee et al. 2002; Nasr et al. 2003; Rosenstock et al. 2004; Liot et al. 2009), así como en el cerebro de animales previamente tratados (Beal et al. 1995; Schultz et al. 1996; Kim et al. 2000). La producción incrementada de ROS puede estar asociada a la inhibición de la cadena de transporte electrónico mitocondrial inducida por el NPA, a pesar de que algunos estudios in vitro indican una discordancia temporal entre ambos eventos (Lee et al. 2002; Liot et al. 2009). Otro efecto relevante del NPA es el incremento de la concentración intracelular del calcio, demostrado en células en cultivo (Mogami et al. 2002; Nasr et al. 2003), lo que está de acuerdo con el estrés nitrosativo detectado en el cerebro de animales tratados con la toxina (Schulz et al. 1995; Matthews et al. 1998a). La perturbación de la homeostasis celular del calcio está aparentemente asociada a la activación de los receptores NMDA de glutamato (Greene et al. 1998; Calabresi et al. 2001; Centonze et al. 2006; Fatokun et al. 2008), pero el mecanismo de activación de estos receptores no es bien conocido. La activación de los receptores NMDA o el fallo energético causado por el NPA permiten el incremento del calcio citosólico, que conduce a la muerte neuronal por vía excitotóxica mediada por la activación de las calpaínas y de la nNOS (Figura 7).

Ya que el estrés oxidativo tiene un papel crítico en la neurotoxicidad del NPA, han sido estudiadas durante los últimos años las acciones protectoras de algunos antioxidantes: la coenzima Q10 (Matthews et al. 1998b), S-alil-cisteína (Herrera-Mundo et al. 2006), vitamina E (Rosenstock et al. 2004) y el precursor de glutatión N-acetilcisteína (La Fontaine et al. 2000). Todos ellos han sido reportados como agentes protectores contra la neurodegeneración inducida por NPA en rata o ratón. Sin embargo, el efecto de flavonoides frente a la toxicidad del NPA no ha sido estudiado.

Los diferentes efectos celulares del NPA incluyen alteraciones de la función mitocondrial y de la homeostasis del calcio y producción de ROS, factores de primera importancia implicados en los procesos neurodegenerativos. Así, el estudio del mecanismo de toxicidad del NPA puede representar un avance en el conocimiento de la compleja interrelación entre los actores

prevalentes en muchos procesos de muerte neuronal, y aportar datos relevantes para potenciales terapias de la HD y otras enfermedades neurodegenerativas asociadas a disfunciones mitocondriales y/o al estrés oxidativo.



**Figura 7:** Muerte necrótica neuronal y posible implicación en la toxicidad celular del NPA. De manera independiente o conjuntamente con el incremento en la producción mitocondrial de ROS, el NPA induce el mecanismo de muerte celular por excitotoxicidad. El aumento en la concentración citosólica del calcio puede resultar de la activación de los receptores de NMDA por un mecanismo desconocido o, sencillamente, de la caída en la producción de ATP inducida por NPA, pero aparentemente no resulta del aumento del glutamato extracelular (Brouillet et al. 2005). La activación dependiente de calcio de la nNOS desempeña un papel efector central en el mecanismo de muerte excitotóxica, que implica también la activación de las calpaínas que actúan sobre diversas proteínas celulares, así como en la sobreproducción observada de peroxinitrito (Bizat et al. 2003a; Artal-Sanz y Tavernarakis 2005). (II): complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial; (NMDA): receptor del ácido N-metil-D-aspartico; (nNOS): óxido nítrico sintasa neuronal; (NPA): ácido 3-nitropropiónico.



### **Sustancias naturales neuroprotectoras. Flavonoides.**

Los flavonoides son una familia de compuestos antioxidantes presentes en la dieta, que mantienen sus metabolitos y su potencial bioactivo como antioxidantes naturales. Estudios experimentales han puesto de manifiesto sus propiedades como agentes protectores frente al estrés oxidativo, proceso éste asociado con numerosas enfermedades, siendo de especial interés los procesos neurodegenerativos. Adicionalmente, los flavonoides han mostrado ser también eficaces como anti-inflamatorios, actuando como moléculas de señalización, modulando enzimas y vías de señalización que permiten la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Desde el punto de vista experimental, se ha señalado que la eficacia farmacológica está basada en su acción antioxidante, capaz de minimizar o evitar los procesos de muerte celular neuronal, la base de la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas, la apoptosis neuronal, así como su actividad anti-colinérgica, mejorando las funciones cognitivas basadas en el aprendizaje y la memoria, por su capacidad de reducir la acumulación de beta amiloides a nivel encefálico. Todos estos datos en conjunto, y teniendo en cuenta su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica, así como por presentar muy baja o nula toxicidad, apoyarían su aplicación terapéutica en procesos de neurodegeneración.

#### *Mecanismo de actuación.*

Las células neuronales del cerebro están más expuestas a procesos de estrés oxidativo, dada su alta actividad metabólica y su baja capacidad de defensa antioxidante que conlleva a un deterioro funcional por producción de sustancias neurotóxicas (Halliwell, 1992). El estrés oxidativo celular causa neurodegeneración en áreas del cerebro en procesos de isquemia-reperfusión, inflamación, y también en enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y otras enfermedades neurodegenerativas (Iadecola, 1997; Van der Veen y col., 1997; Andrus y col., 1998; Beal 2002).

Se ha planteado que determinados componentes de la dieta aumentan la función neuronal y la plasticidad sináptica, a través de una acción antioxidante, anti-inflamatoria y de regulación de moléculas señales. Los flavonoides, son

compuestos fenólicos constituyentes de la parte no energética de la dieta humana que se encuentran en vegetales, semillas, frutas y en bebidas como vino y cerveza y que han mostrado esta capacidad de acción (Halliwell, 2001; Martínez-Florez y col., 2002; Yu y col., 2006; Joseph y col., 2007; Gómez-Pinilla, 2008).

Los flavonoides destacan desde el punto de vista farmacológico por su baja toxicidad y por presentar numerosos efectos biológicos y actividades terapéuticas. Estos compuestos tienen efectos antioxidantes, reducen la formación de radicales libres, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas (López Luengo, 2002).

La actividad biológica de los flavonoides y sus metabolitos dependen de su estructura química y de los diversos sustituyentes de la molécula, ya que la estructura de base puede someterse a un número de cationes de modificaciones tales como glicosilación, esterificación, amidación, hidroxilación, entre otros trastornos que modulan la polaridad, y la dirección de toxicidad intracelular de estos compuestos (Huber y Rodríguez-Amaya, 2008).

En proceso de estrés oxidativo, los flavonoides podrían actuar directamente eliminando radicales libres: anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilos y óxido nítrico derivados de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente peroxinitrito y dióxido de nitrógeno, que son altamente neurotóxicos (Gutiérrez-Merino, 2008) así como, activando vías regulatorias y también podrían actuar indirectamente incrementando la defensa celular antioxidante, modulando cascadas de señales de expresión de genes implicados en la regulación de supervivencia celular o en muerte celular programada o apoptosis (Spencer y col., 2003; Kang y col., 2004).

Los flavonoides, al limitar la acción de los radicales libres, reducen el riesgo de cáncer, mejoran los síntomas alérgicos y de artritis, aumentan la actividad de la vitamina C, bloquean la progresión de las cataratas y la degeneración macular, evitan las tufaradas de calor en la menopausia y

combaten otros síntomas (Hertog y col.1995). Además combaten la inflamación (Sen y col. 2002) y las alergias y aumentan la efectividad de las células natural killer del sistema inmunológico (Bagchi y col. 2002).

En los últimos años, diversos estudios se han centrado en analizar diferentes tipos de flavonoides que puedan atravesar la barrera hematoencefálica con capacidad para intervenir en procesos de neurodegeneración y promover funciones cerebrales (Gutierrez-Merino, 2011; Hwang y col., 2012; Ebrahimi y Schluesener, 2012; Tamilselvam y col., 2013).

Actualmente, no hay un tratamiento para detener o curar estas enfermedades neurodegenerativas y han sido consideradas estrategias terapéuticas alternativas (Lovell, 2007). Dado que la fisiopatología de estas enfermedades cursan con daño oxidativo neuronal, acumulación de iones de hierro en el cerebro y disminución celular de antioxidantes, diversos estudios se centran en analizar la eficacia de diferentes clases de flavonoides para reducir o bloquear el estrés oxidativo y la muerte neuronal (Gotz y col., 1990.; Halliwell, 1992; Weinreb y col., 2004; Ramassamy, 2006; Wang y col., 2009; Bieschke y col., 2010).



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **Animales de experimentación.**

Los protocolos experimentales llevados a cabo en animales han sido desarrollados aplicando la ley española y las directrices de la Unión Europea para investigación animal, y aprobados por el Comité de Ética de Experimentación Animal y la Comisión de Bioética y Bioseguridad de la Universidad de Extremadura.

En la presente Tesis Doctoral se han utilizado ratas Wistar, machos, con 2-2.5 meses de edad y un peso de 280-320 g (Figura 8).

Todas las ratas fueron mantenidas por el Servicio de Animalario de la Universidad de Extremadura, donde se alimentaron con agua y pienso con libre acceso a los mismos.

Fueron sometidas a ciclos de luz y oscuridad de 12 horas, a una temperatura constante de 22-23 °C y una humedad que osciló entre el 60 y el 80%.



**Figura 8:** En la presente Tesis Doctoral se han utilizado ratas Wistar, machos, con 2-2.5 meses de edad y un peso de 280-320 g.

### Preparación de secciones histológicas de encéfalo.

Los animales fueron anestesiados con ketamina (50 mg/g; Pfizer), diazepam (2,5 mg/g B.Braun) y atropina (0,05 mg/g; B.Braun), intraperitoneal, y sacrificados por decapitación. Inmediatamente después, los encéfalos fueron extraídos (Figura 9) y colocados en tampón fosfato salino (PBS) en hielo. Los encéfalos fueron fijados en paraformaldeído (4% en PBS) durante 7 días, deshidratados en una serie de alcoholes de concentraciones crecientes, incluidos en parafina y cortados en secciones de 8-10  $\mu$ m (microtomo Leica RM2125RT).

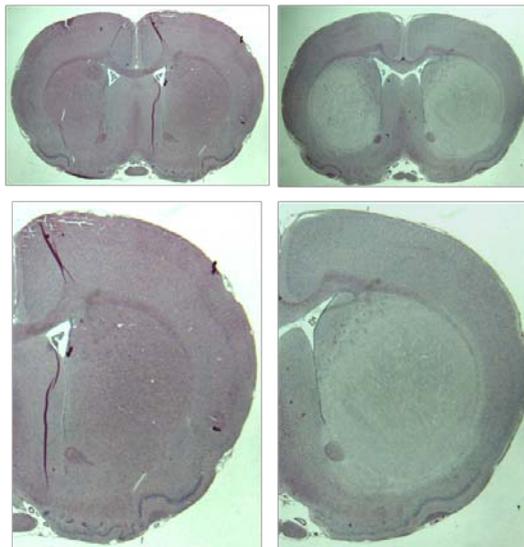
Posteriormente, las secciones fueron preparadas para tinciones histológicas (Hematoxilina-eosina y tinción de Nissl) y técnicas inmunocitoquímicas (con sus correspondientes anticuerpos y controles), siendo observadas bajo el microscopio (Nikon digital DS-F1 y Zeiss Axio imager) y fotografiadas con cámara controlada mediante *software* Image-Pro Plus (Media Cybernetics, Warrendale, PA, USA).



**Figura 9:** Imágenes de encéfalos de rata extraídos de la cavidad craneal para su posterior estudio mediante secciones frontales o coronales.

### ***Tinción de hematoxilina-eosina.***

Para efectuar esta tinción las secciones fueron desparafinadas en xilol e hidratadas en una serie de etanol de concentraciones decrecientes. Posteriormente fueron teñidas (Figura 10) con hematoxilina de Harris (Panreac), lavadas con agua y teñidas con eosina (Merck) al 0,5%. A continuación, los cortes se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se montaron usando medio de montaje permanente (Eukit).



**Figura 10:** Secciones coronales de encéfalos de rata adulta, teñidos con hematoxilina-eosina. En las imágenes superiores se observan ambos hemisferios cerebrales, correspondientes a rata control (izquierda) y rata experimental tratada con NPA (derecha). En las imágenes inferiores se aprecia (derecha) la zona de lesión ocasionada tras el procedimiento experimental.

### ***Tinción de Nissl.***

Una vez desparafinados e hidratados, los cortes fueron sumergidos en reactivo de Nissl: violeta de cresilo al 0,1% en ácido acético 0,25%. Trascorridos 5-6 minutos a 56 °C, se dejó enfriar durante 30 minutos y se lavaron en agua corriente. Se diferenció en alcohol etílico al 96% durante 4-5 minutos y, tras un lavado de 1 minuto con nuevo alcohol etílico al 96%, se deshidrató en alcohol al 100%. Los cortes montados usando medio de montaje permanente (Eukit).

**Análisis inmuno-histoquímico: detección de sinaptofisina, calbindina, proteína ácida fibrilar glial (GFAP) y neurogranina.**

Las secciones, desparafinadas e hidratadas, fueron bloqueadas con 1% albúmina sérica bovina (BSA) en PBS (buffer fosfato salino) durante 30 min y posteriormente con 1,5% de suero normal, de caballo o de cabra, en 1% de BSA y 0,1% de Tritón X-100 durante 1 h. Posteriormente las secciones fueron incubadas, durante toda la noche a 4°C en cámara de humedad, con el anticuerpo primario (dilución 1:50):

Sinaptofisina: *mouse anti-SYP* (Santa Cruz Biotechnology: sc17750).

Calbindina: *goat anti-calbindin D28 K* (Santa Cruz Biotechnology: sc791).

Proteína ácida fibrilar glial (GFAP): *mouse anti-GFPA* (Sigma: G3893).

Neurogranina (dilución 1:500): *rabbit antineurogranin polyclonal* (Chemicon AB5620).

Después de ser lavadas 3 veces en PBS, las secciones fueron bloqueadas de nuevo y se incubaron, durante 3 h a temperatura ambiente, con el correspondiente anticuerpo secundario (dilución 1:100):

*Goat anti-mouse immunoglobulin G conjugated with alkaline phosphatase* (IgG-AP) (Santa Cruz Biotechnology: sc3698).

*Donkey anti-goat immunoglobulin G conjugated with alkaline phosphatase* (IgG-AP) (Santa Cruz Biotechnology: sc3852).

*Goat anti-rabbit immunoglobulin G conjugated with alkaline phosphatase* (IgG-AP) (Santa Cruz Biotechnology: sc3812).

Las secciones fueron repetidamente lavadas en PBS y reveladas con nitroazul de tetrazolio (NBT)/5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (Roche 1681451). Después de un lavado en agua, las secciones fueron deshidratadas en alcohol, aclaradas en xileno y montadas en Eukit.

### **Análisis inmuno-histoquímico: detección de $Cb_5R$ y $Cb_5$ .**

Inicialmente se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena mediante la administración de 0,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente se bloqueó con 1% BSA en PBS durante 30 min e incubación con 1,5% de suero normal de cabra, en 1% de BSA y 0,1% de Tritón X-100 durante 2 h.

Posteriormente las secciones fueron incubadas, durante toda la noche a 4°C en cámara de humedad, con el anticuerpo primario (dilución 1:50):

Anti-Cb<sub>5</sub>R: *rabbit anti-Cb<sub>5</sub>* (anti-DIA1; Protein Tech Group: 10894-1-AP).

Anti-Cb<sub>5</sub>: *rabbit anti-Cb<sub>5</sub>* (Santa Cruz Biotechnology: sc33174).

Tras varios lavados en PBS, las secciones fueron bloqueadas de nuevo e incubadas, durante 3 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario:

*Biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulina G* (Vectastain ABC Kit; Vector Laboratories, PK-6101).

Las secciones fueron repetidamente lavadas en PBS e incubadas con avidina biotinilada (horseredish peroxidase complex, Vectastain ABC Kit) durante 30 min a temperatura ambiente. El revelado cromógeno fue llevado a cabo mediante una solución de sustrato de peroxidasa (Vector VIP substrate, SK4600). Finalmente, las secciones fueron lavadas en agua destilada, deshidratadas y montadas en Eukit.

### ***Microscopía Confocal.***

Adicionalmente se llevaron a cabo observaciones bajo el microscopio confocal (Bio-Rad MRC1024). Para ello, un grupo de secciones fueron sometidas a bloqueo mediante 1% BSA en PBS durante 30 min, seguido de incubación con 1,5% de suero normal de oveja en 1% de BSA y 0,1% de Tritón X-100 durante 2 h. Seguidamente se establecieron dos grupos de secciones, que se incubaron en cámara húmeda toda la noche a 4°C, en los siguientes anticuerpos primarios (a dilución 1:50):

Grupo 1: *rabbit anti-Cb<sub>5</sub>R* (anti-DIA1; Protein Tech Group: 10894-1-AP), junto con *mouse anti-GFAP* (Sigma: G3893).

Grupo 2: *rabbit anti-Cb<sub>5</sub>* (Santa Cruz Biotechnology: sc33174) junto con *mouse anti-GFAP* (Sigma: G3893).

Las secciones fueron repetidamente lavadas en PBS y posteriormente bloqueadas con 1% BSA en PBS durante 30 min, y a continuación con 1,5% de suero normal de cabra, en 1% de BSA y 0,1% de Tritón X-100 durante 30 min. Las secciones fueron incubadas, durante 3 h a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario (dilución 1:100):

*Sheep anti-rabbit IgG-Cy3* (Sigma: C2306).

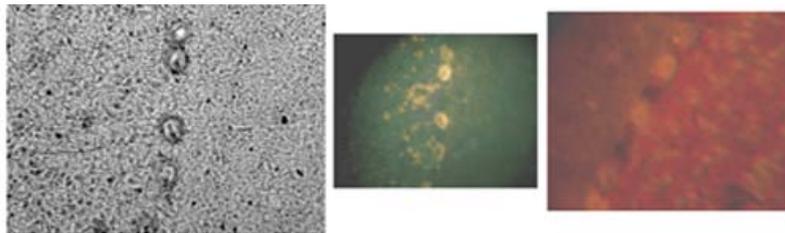
*Goat anti-mouse IgG-Alexa488* (Invitrogen A11001).

Las secciones fueron lavadas en PBS e inmediatamente observadas y fotografiadas mediante microscopía confocal.

### ***Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (Förster).***

*FRET: fluorescence resonance energy transfer.*

Transmisión de energía de resonancia o transferencia de energía de resonancia de Förster es un mecanismo de transferencia de energía entre fluorocromos. Se basa en que la excitación de un cromóforo puede transferirse a otro cercano, generalmente cuando ambos se sitúan en la misma molécula, mediante un mecanismo acoplador dipolo-dipolo. Precisa una gran cercanía entre los fluorocromos (Figura 11), en torno a 10-100 Å, para lo cual el espectro de absorción del cromóforo aceptor debe superponerse el espectro de emisión de fluorescencia del donador (Samhan-Arias et al., 2009, 2011; Marques-da-Silva et al., 2010; Marques-da-Silva y Gutierrez-Merino, 2012).



**Figura 11:** Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (Förster).



## **Modelos experimentales.**

### ***1.- Administración de ácido 3-nitropropiónico.***

Ácido 3-nitropropiónico (NPA; Sigma N5636) fue administrado mediante de inyecciones intraperitoneales de soluciones al 20 mg/ml en salino (0,9%(m/v) NaCl), preparadas a diario, disolviendo una cantidad pesada de NPA sólido en salino estéril, a pH a 7,4 ajustado con NaOH 5 M y filtrando en filtro estéril con poro de 0,2 mm, estéril.

### ***2.- Modelo de neuroprotección con kaempferol.***

En el estudio de protección frente a la neurotoxicidad del NPA, el flavonoide kaempferol (Sigma) fue administrado intraperitonealmente en una solución-vehículo 2,4%(v/v) DMSO en salino. Previas descripciones revelaron que inyecciones intraperitoneales diarias de hasta 35 mg de kaempferol/kg de peso corporal durante un periodo de 3 días no tenía efectos tóxicos en ratas (López-Sánchez et al. 2007). Para este estudio, fueron constituidos 5 grupos de ratas: K7, K14, K21, NPA y Control. El grupo K7 (n=10) recibió una primera inyección de kaempferol, en una dosis de 7 mg/kg, 48 horas antes de empezar el tratamiento con NPA. Del día 0 al 5 de tratamiento, una dosis de 25 mg de NPA/kg fue administrada cada 12 horas, a las 9:00 a.m. y 9:00 p.m. Diariamente, 30 minutos antes de la inyección matinal de NPA, otra dosis de 7 mg/kg de kaempferol fue inyectada a las ratas. Los grupos K14 y K21 (n=8 en ambos casos) fueron tratados de manera idéntica, excepto que la dosis de flavonoide administrada en cada inyección fue de 14 y 21 mg/kg, respectivamente. Las ratas del grupo NPA (n=21) fueron tratados con 25 mg NPA/kg cada 12 horas durante 5 días y, en lugar del kaempferol, recibieron inyecciones de 1 ml con 2,4%(v/v) DMSO en salino 48 horas previamente al tratamiento con NPA y cada día 30 minutos antes de cada inyección matinal de NPA. Un grupo de ratas Control (n=6) recibió 1 ml de 2,4%(v/v) DMSO en salino (vehículo del kaempferol) y 0,4 ml de salino (vehículo del NPA), a los mismos tiempos que los grupos de tratamiento.

## **Detección y cuantificación del kaempferol en el plasma de ratas**

### ***Extracción y tratamientos enzimáticos***

Las muestras de plasma fueron acidificadas a pH 5 con ácido acético, mezcladas con igual volumen de acetonitrilo y agitadas durante 5 minutos. Se centrifugó a 10000g durante 10 minutos, se separó el sobrenadante y el precipitado fue de nuevo extraído con acetonitrilo. La extracción se repitió una vez más y los 3 extractos se combinaron para análisis cromatográfico.

Para el estudio de los metabolitos, se incubaron alícuotas de plasma con una preparación de b-glucuronidasa/sulfatasa 1200/10 U/ml (tipo HP-2 de Helix pomatia; producto G7017 de Sigma) o con b-glucuronidasa 10000 U/ml (tipo IX-A de Escherichia coli; G7396 de Sigma). Las muestras se incubaron con las enzimas a 37 °C y, transcurridas 2 horas, se procedió a la extracción con acetonitrilo como se ha descrito en el párrafo anterior.

### ***Análisis cromatográfico***

Los extractos fueron analizados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase reversa usando un sistema Agilent 1100 equipado con una columna C8 de base sílica y un detector de diodos. La fase móvil consistió en un gradiente binario de ácido fosfórico 0,1% (disolvente A) y acetonitrilo (disolvente B), a un flujo de 1 ml/min con la siguiente programación: 20% B (0-2 min); 20-35% B (2-22 min); 35% (22-24 min); 35-20% (24-32 min). Los cromatogramas se registraron a 370 nm y el detector de diodos fue también usado para registrar los espectros de absorción de los metabolitos.

El área de cada pico en el cromatograma fue determinada y la concentración del metabolito calculada usando una recta de calibración obtenida con patrones de kaempferol en las mismas condiciones de análisis.

## Exploración.

A lo largo de cada tratamiento, los animales fueron pesados y se observó su comportamiento general, una o dos veces al día, inmediatamente antes de las inyecciones. La afectación motora en particular fue valorada usando una escala cuantitativa previamente descrita (Quary et al. 2000), la cual gradúa la presencia y gravedad de varios déficits motores: anomalías en el andar; distonía en las extremidades posteriores; capacidad para “agarrar” con las extremidades anteriores; equilibrio y recumbencia. La graduación (de 0 a 8) fue calculada siguiendo la escala:

<i>Anormalidades en el andar</i>	<i>graduación máxima = 1</i>
Andar descoordinado y “wobbling”	<i>graduación</i> □ +1
<i>Distonía en las extremidades posteriores</i>	<i>graduación máxima = 3</i>
Distonía intermitente en 1 extremidad posterior (movimientos lentos)	<i>graduación</i> □ +1
Distonía intermitente en las 2 extremidades posteriores	<i>graduación</i> □ +2
Distonía permanente en las 2 extremidades posteriores	<i>graduación</i> □ +3
<i>Fuerza</i>	<i>graduación máxima = 1</i>
Incapacidad para agarrar la rejilla de la jaula, durante unos segundos	<i>graduación</i> □ +1
<i>Equilibrio</i>	<i>graduación máxima = 1</i>
Incapacidad para mantenerse en equilibrio en una plataforma de 5x10 cm (altura 15 cm, Figura 7)	<i>graduación</i> □ +1
<i>Recumbencia</i>	<i>graduación máxima = 2</i>
Acostado en un lado, pero se mueve cuando es estimulado (recumbencia lateral)	<i>graduación</i> □ +1
Recumbencia ventral, apariencia moribunda, con parálisis casi completa (respiración rápida)	<i>graduación</i> □ +2

## **Técnica anatómica y análisis histológico**

Al final de los tratamientos, las ratas fueron anestesiadas y sacrificadas por decapitación. Inmediatamente después, los encéfalos fueron extraídos y colocados en PBS en hielo. Los destinados a estudios histológicos se fijaron e incluyeron en parafina.

Los encéfalos destinados al estudio de lesión fueron cortados en secciones coronales de 1,0 mm de espesor utilizando un cortador estándar de tejidos (Stoeling, Woodale, IL, EE.UU).

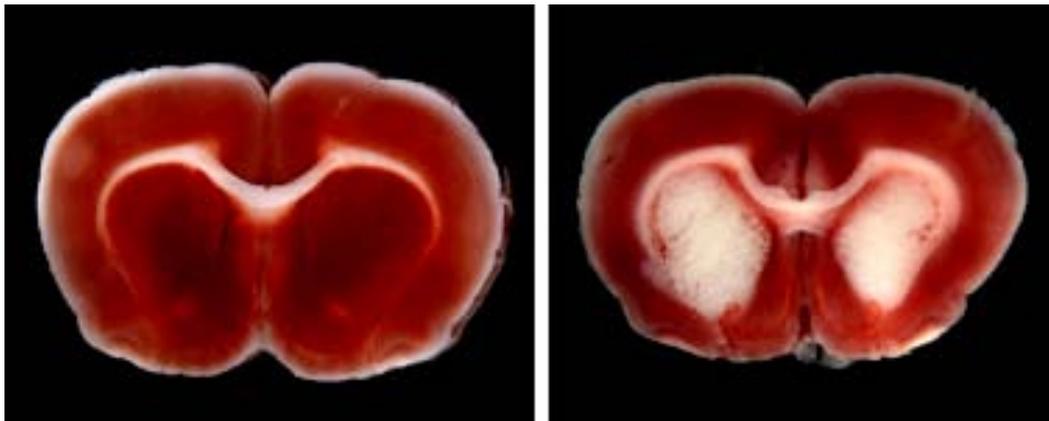
Las muestras para los estudios bioquímicos fueron recortadas de ambos hemisferios cerebrales de una sección coronal de 2,5 mm de espesor cortada a 4,5 mm del polo frontal del cerebro. Los tejidos fueron rápidamente congelados en nitrógeno líquido y conservados a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

## Estudios histológicos

### Determinación de la lesión cerebral por tinción de TTC

La lesión inducida por los tratamientos con NPA fue examinada por tinción de secciones recién cortadas con cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio (TTC). Las secciones cerebrales se colocaron en PBS en hielo. Seguidamente, el PBS fue sustituido por una solución de TTC a una concentración del 2% en PBS y se incubó en estufa a 37°C durante 15 minutos. Las dos caras de los cortes teñidos fueron observadas al microscopio y fotografiadas (Figura 12).

Para determinar el volumen de la lesión en el estriado cerebral, las áreas dañadas observadas como áreas blancas en los cortes teñidos con TTC se midieron usando el software GIMP 2.2. Posteriormente, el volumen de lesión fue calculado a partir de las áreas dañadas e integración considerando el espesor de cada sección.

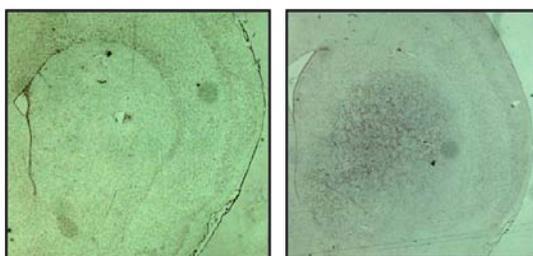


**Figura 12:** Secciones coronales de encéfalos de rata adulta, teñidos con TTC. En la imagen de la izquierda se observan ambos hemisferios cerebrales, correspondientes a rata control, y a la derecha de rata experimental tratada con NPA. Nótese en blanco la zona de lesión ocasionada tras el procedimiento experimental.

## Ensayo de TUNEL

El ensayo de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick End Labeling) se aplicó a secciones incluidas en parafina adheridas a portaobjetos previamente recubiertos con 3-aminopropiltriétoxilano (Sigma). El ensayo de TUNEL se realizó empleando un kit de detección in situ de muerte celular (Roche), y las células marcadas fueron observadas al microscopio usando un kit de revelado de la peroxidasa (Vector VIP substrate kit, Vector Laboratories).

Las secciones fueron desparafinadas, hidratadas en una serie de alcoholes decrecientes y fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos. Después de dos lavados en PBS, los cortes fueron tratados con peróxido de hidrógeno y con proteinasa K y nuevamente fijados con paraformaldehído. Después de sumergirlos en 0,25% Tween-20 en PBS, los cortes fueron incubados durante 2 horas a 37 °C, con la mezcla del kit TUNEL que contiene la enzima y el nucleótido conjugado con fluoresceína. Tras lavarlos con PBS, los cortes fueron bloqueados primero con BSA a una concentración del 1% en PBS y después con suero normal de cabra (Sigma) al 1,5% en PBS suplementado con 0,1% Triton X-100. A continuación, los cortes fueron incubados durante 3 horas con anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con peroxidasa (Roche) y, posteriormente, revelados con el kit de detección de peroxidasa. Para terminar, los cortes fueron deshidratados y montados. Se obtuvieron fotografías digitales de los cortes al microscopio (Figura 13) y el número de células TUNEL-positivas fue contado usando el software ImageJ 1.41 (National Institutes of Health, USA).



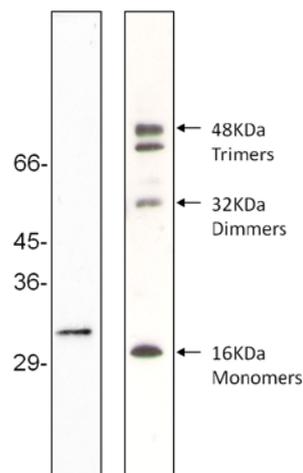
**Figura 13:** Secciones coronales de encéfalos de rata adulta, teñidos con TUNEL. En la imagen de la izquierda se observan la rata control, y a la derecha de rata experimental tratada con NPA. Nótese TUNEL positivo en las células apoptóticas.

## RESULTADOS



En la presente Tesis Doctoral hemos llevado a cabo un estudio de la distribución regional y celular del sistema redox  $Cb_5R/Cb_5$  en el cerebro de rata adulta, utilizando para ello técnicas inmunocitoquímicas, que han puesto de manifiesto altos niveles de expresión de este sistema en diferentes localizaciones a nivel de los distintos sectores del encéfalo.

En primer lugar, hemos seleccionado los anticuerpos que muestran una alta especificidad para la isoforma 3- $Cb_5R$  y para  $Cb_5$ , en lisados de cerebro de rata adulta mediante técnicas de Western Blotting (Figura 14), una vez que hemos explorado varios anticuerpos frente a estas proteínas comercialmente disponibles. La utilización del anti-isoforma 3- $Cb_5R$  de conejo (o anti-DIA1; Protein Tech Group: 10894-1-AP) mostró una única banda inmunoreactiva en los lisados de cerebro de rata adulta, con el esperado peso molecular de la isoforma 3- $Cb_5R$ . La utilización del anti- $Cb_5$  de conejo (Santa Cruz Biotechnology: sc 33174) mostró bandas inmunoreactivas de pesos moleculares correspondientes a monómeros, dímeros y trímeros de  $Cb_5$ , proteína que expresa dos principales isoformas, soluble y unida a membrana (Samhan-Arias y Gutiérrez Merino, 2014b) y que ha demostrado formar agregados homoméricos en células vivas (Storbeck et al., 2012).



**Figura 14:** Western-blot de lisados de cerebro de rata adulta (2,5 g de proteína por carril) con conejo anti- $Cb_5R$  isoforma 3 (anti-DIA1; Protein Tech Grupo: 10894-1-AP, dilución 1: 100) y con anti- $Cb_5$  (Santa Cruz Biotechnology: sc 33174, dilución 1: 100).

Atendiendo a los resultados, éstos fueron los anticuerpos primarios seleccionados para inmunocitoquímica en las secciones de cerebro de rata adulta. Por ello, en la presente Tesis Doctoral, las alusiones realizadas en nuestros resultados sobre  $Cb_5R$  serán referentes a la isoforma 3- $Cb_5R$ .

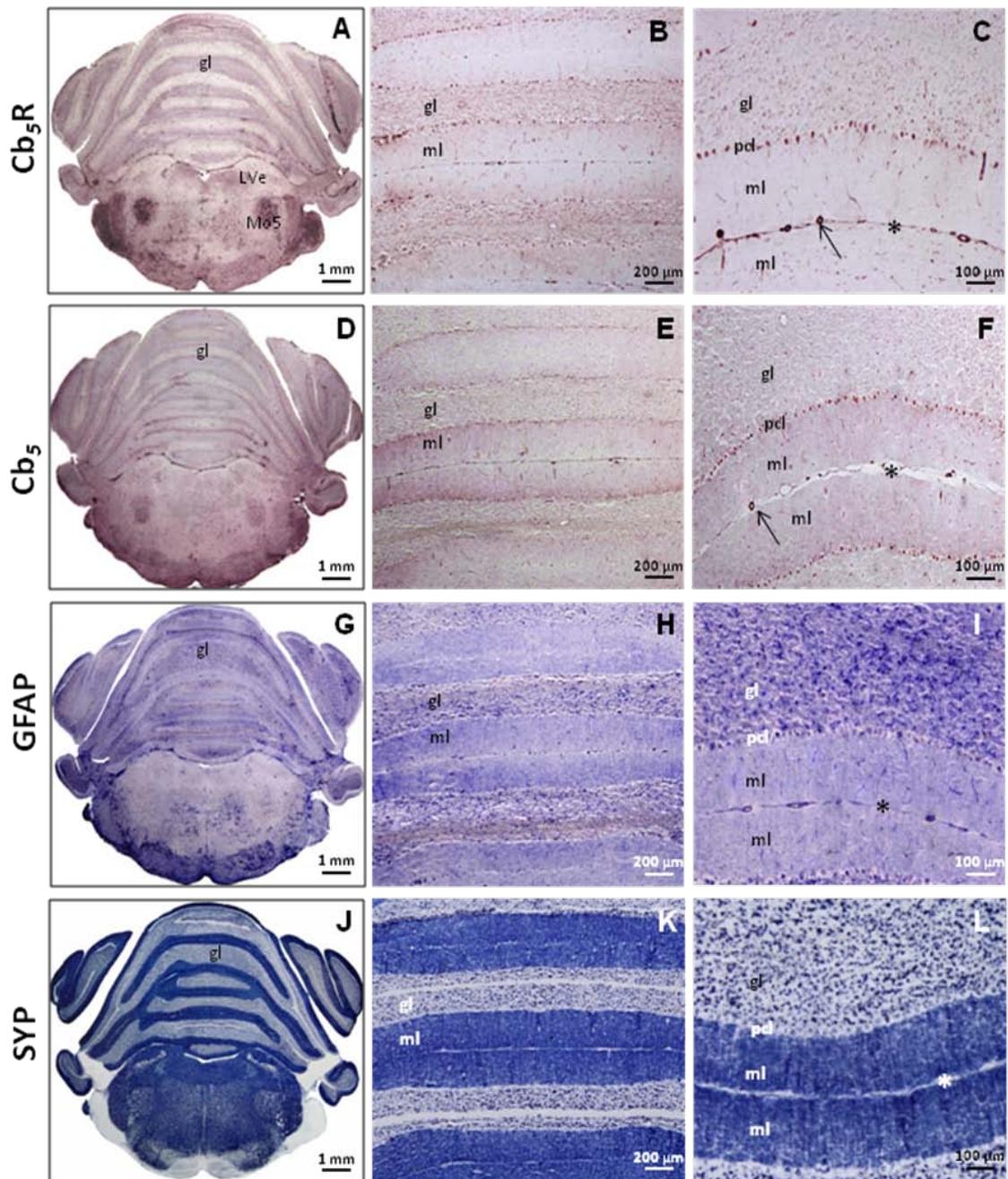
Ya que el sistema redox  $Cb_5R/Cb_5$  ha mostrado jugar un importante papel en el proceso de apoptosis mediado por estrés oxidativo en cultivos de neuronas de cerebelo de rata adulta (Samhan-Arias et al., 2009,2012), mostraremos en primer lugar la distribución regional y celular de este complejo enzimático que hemos observado en secciones de cerebelo.

### **Regionalización de la expresión de isoforma 3-Cb<sub>5</sub>R/Cb<sub>5</sub> en la corteza de cerebelo de rata adulta.**

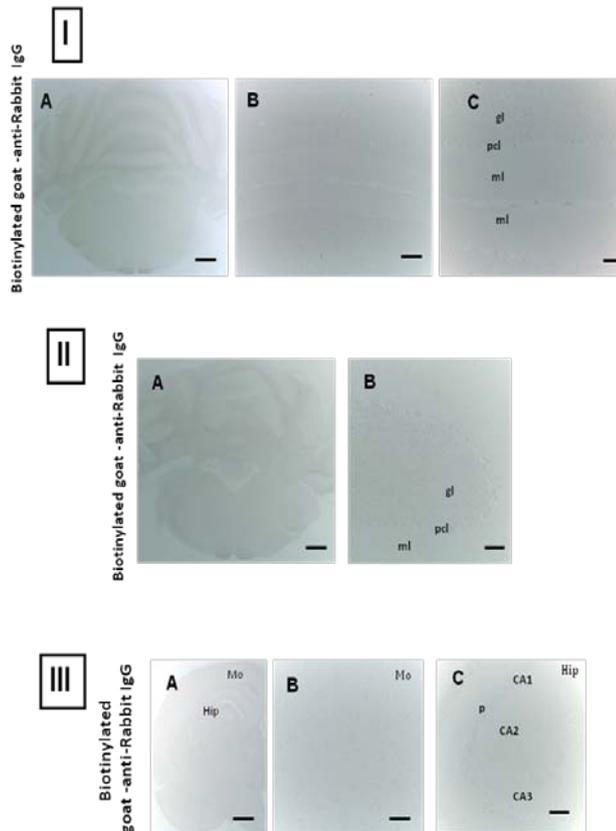
Nuestros resultados ponen de manifiesto (Figura 15) que la distribución de Cb<sub>5</sub>R en la corteza cerebelar es mucho más intensa en la capa granular que en la capa molecular (Figura 15 A-C), mientras que la distribución de Cb<sub>5</sub> es más difusa en ambas capas (Figura 15 D-F). Los controles llevados a cabo sustituyendo los anticuerpos primarios por IgG de conejo, o simplemente omitiendo el paso del primer anticuerpo, y aplicando posteriormente el anticuerpo secundario (una inmunoglobulina de cabra anti-conejo) puso de manifiesto una ausencia de tinción en las secciones cerebelares (Figura 16).

De modo significativo, observamos una intensa señal tras la tinción con la Cb<sub>5</sub>R y Cb<sub>5</sub> entre las capas granular y molecular (Figura 15 A-F), área correspondiente a la localización de la capa de células de Purkinje.

Es de especial interés, la presencia de tinción observada mediante la utilización de ambos anticuerpos a nivel de la vascularización del cerebelo, en particular a nivel de la red capilar que se encuentra en íntima relación con la Piamadre meníngea (Figura 15 C,F). Estos resultados son consistentes con la descrita bien marcada expresión del sistema Cb<sub>5</sub>R/Cb<sub>5</sub> en eritrocitos, donde juega un papel catalizador de la actividad metahemoglobina-reductasa (Hultquist y Passon, 1971; Leroux et al., 1975; Vieira et al., 1995; Aalfs et al., 2000), así como a nivel de las células endoteliales (Chatenay-Rivauday et al., 2004).



**Figura 15:** Micrografías de secciones coronales a nivel del cerebelo y tronco del encéfalo tras inmunohistoquímica con anticuerpos anti- $Cb_5R$  isoforma 3 (A), anti- $Cb_5$  (D), anti-GFAP (G), y anti-SYP (J). En corteza cerebelosa, anti- $Cb_5R$  (A, B) y anti-GFAP (G, H) marcan principalmente la capa granular (gl), mientras que anti- $Cb_5$  (D, E) y anti-SYP (J, K) muestran un mayor nivel de expresión en la capa molecular (ml). La capa de células de Purkinje (pcl) está marcada con anti- $Cb_5R$  (C) y anti- $Cb_5$  (F). Además, la vascularización del cerebelo (flechas) se observa (C, F), particularmente ligado a la piamadre (asteriscos). Nótese a nivel de tronco del encéfalo los elevados niveles de expresión de  $Cb_5R$  (A) en el área vestibular lateral (LVe) y núcleo motor trigémino (Mo5), entre otros.



**Figura 16:**

(I) control para la Figura 15: Los anticuerpos primarios fueron sustituidos con IgG de conejo y posteriormente fueron tratados con el anticuerpo secundario de cabra biotinilado anti-conejo IgG). Micrografías ópticas de secciones coronales a nivel del cerebelo y tronco del encéfalo mostraron falta de tinción significativa con anti-IgG de conejo (A-C) en comparación con la observada después de la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti- $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$ . Barras: IA (1 mm), IB (200 micras), IC (100 micras). Imágenes similares se obtuvieron utilizando el anticuerpo secundario solo.

(II) Control para la Figura 18: Los anticuerpos primarios fueron sustituidos con IgG de conejo y posteriormente fueron tratados con el anticuerpo secundario utilizado cabra biotinilado anti-conejo IgG. Micrografías de secciones coronales a nivel del cerebelo y tronco cerebral mostraron falta de tinción significativa con anti-IgG de conejo (A, B) en comparación con la observada después de la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti- $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$ . Barras: IIA (1 mm), IIB (100 micras). Imágenes similares se obtuvieron utilizando solo el anticuerpo secundario.

(III) Control para las Figuras 25 y 26. Imágenes de los controles realizados solo con el anticuerpo secundario mostraron ausencia de tinción. A: Área somatomotriz de la corteza cerebral (Mo) y la región hipocámpal (Hip), con magnificación en (B) y (C). C: Cuerno Ammon de región hipocámpal. capa piramidal (p) del cuerno de Ammon (CA1, CA2 y CA3: campos piramidales). Barras: IIIA (0,75 mm), IIIB (100 micras), IIIC (100 micras).

Al objeto de establecer una descripción más precisa de la regionalización y distribución celular de  $Cb_5R$  y  $Cb_5$  en las secciones del cerebelo, hemos analizado cortes consecutivos mediante tinción con dos anticuerpos:

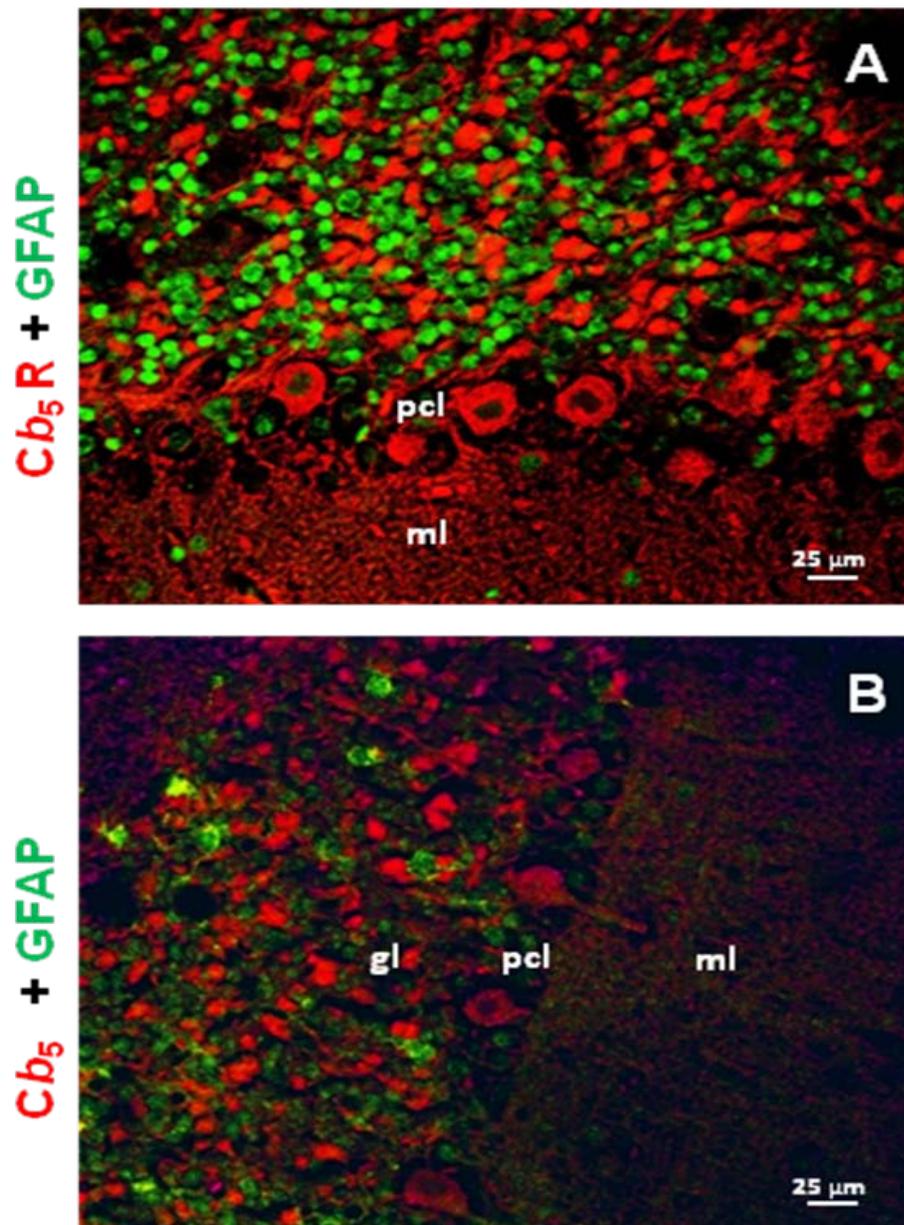
- anti-GFAP (Figura 15 G-I), un marcador de astrocitos y células gliales (Nakamura y Uchihara, 2004; Taft et al., 2005; Roda et al., 2008),

- y anti-SYP (Figura 15 J-L) específicamente asociada con sinapsis unidas a vesículas de secreción (Fujita et al., 1996; Nakamura y Uchihara, 2004).

Nuestros resultados muestran que ambos anticuerpos son detectables en ambas capas de la corteza cerebelar, granular y molecular. Sin embargo, la capa granular muestra una tinción más intensa con anti-GFAP (Figura 15H), mientras que la capa molecular muestra una mayor intensidad de tinción con anti-SYP (Figura 15K).

Aunque esta regionalización muestra una aparente distribución similar para la tinción con  $Cb_5R$  y  $Cb_5$  respectivamente, una observación microscópica más detallada (Figura 15 C,F,I,L) pone de manifiesto que la distribución celular no es estrictamente coincidente.

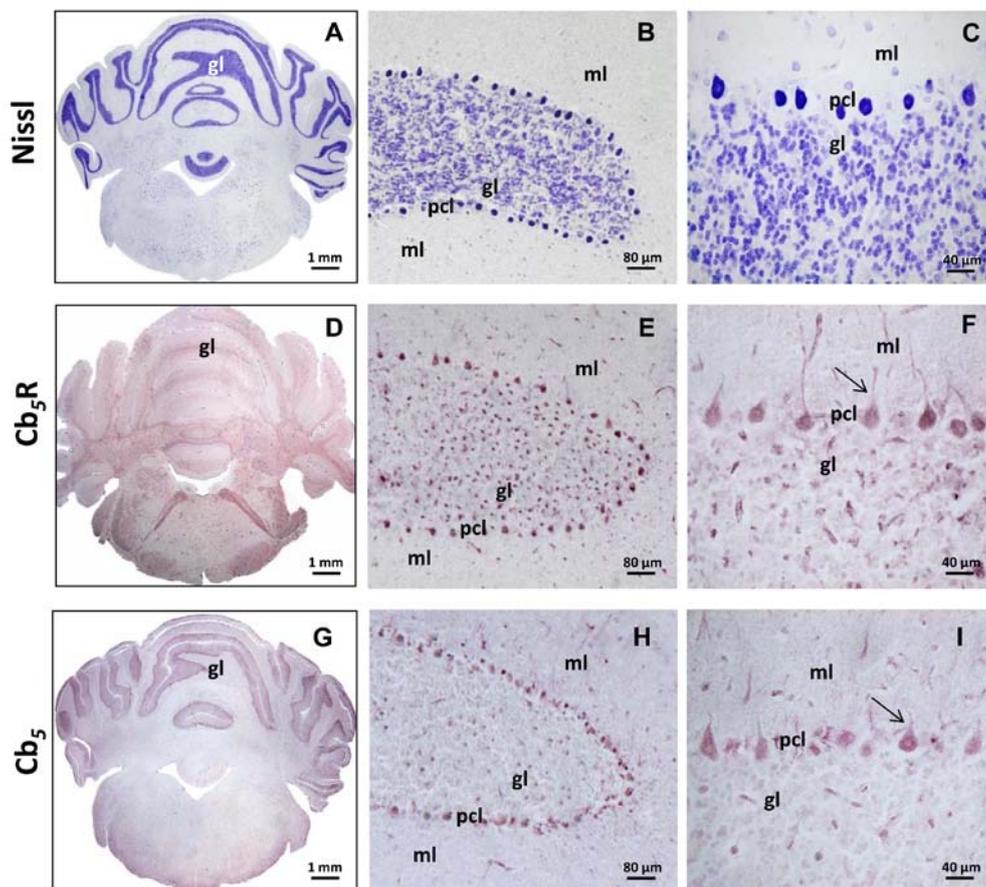
Un preciso análisis mediante microscopía confocal (Figura 17) tras doble tinción con anti- $Cb_5R$  y anti-GFAP (Figura 17A), así como mediante doble tinción con anti- $Cb_5$  y anti-GFAP (Figura 17B), revela que las células que muestran una mayor intensidad con  $Cb_5R$ , o con anti- $Cb_5$ , no se corresponden con astrocitos ni células gliales, los cuales están marcadamente teñidos con anti-GFAP.



**Figura 17:** Imágenes de microscopía confocal de la corteza cerebelosa teñidas con anti-GFAP (canal verde), y anti-Cb<sub>5</sub>R y anti-Cb<sub>5</sub> (canal rojo). Panel A: Imagen de microscopía confocal de la corteza cerebelosa teñida doblemente con anti-GFAP (verde) y anti-Cb<sub>5</sub>R (rojo). Panel B: Imagen de microscopía confocal de la corteza cerebelosa teñida con anti-GFAP (verde) y anti-Cb<sub>5</sub> (rojo). Las imágenes revelaron que los somas celulares más intensamente teñidos con anti-Cb<sub>5</sub>R y con anti-Cb<sub>5</sub> no corresponden con los cuerpos celulares teñidos por anti-GFAP (células gliales y astrocitos). gl: capa granular; pcl, capa de células de Purkinje, ml: capa molecular.



Para obtener datos más específicos acerca de la regionalización de  $Cb_5R$  y  $Cb_5$  en la capa granular, hemos estudiado secciones de cerebelo mediante tinción con la técnica de Nissl (Pilati et al., 2008), la cual marca el retículo endoplasmático, principalmente asociado con los cuerpos neuronales de esta capa (Figura 18). Tal como puede observarse (Figura 18 A-F) la tinción de Nissl y la señal de  $Cb_5R$  están altamente marcadas en los cuerpos neuronales de la capa granular, así como en el área correspondiente a la capa de células de Purkinje (Figura 18 E,F), siendo poco evidente la señal de  $Cb_5$  (Figura 18 H,I).



**Figura 18:** Micrografías de secciones coronales en cerebelo y a nivel del tronco cerebral tras la tinción de Nissl (A, B y C) e inmunohistoquímica con anticuerpos anti- $Cb_5R$  (D, E y F) y anti- $Cb_5$  (G, H e I). Las abreviaturas gl, pcl y ml tienen el significado indicado en la Figura 17. La tinción de Nissl y anti- $Cb_5R$  marcan la mayoría de las células de la granular (gl) y de las capas de células de Purkinje (pcl), mientras que es de menos intensidad con anti- $Cb_5$ . Magnificación en los paneles C, F e I para resaltar la señal en el tronco dendrítico de las células de Purkinje con anti- $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$  (flechas), aunque menos intensa en este último caso.

Estos datos están en concordancia con previas descripciones (Borgese et al. 1993), en las que se establece una predominante localización subcelular de  $Cb_5R$  en el retículo endoplasmático de las células de mamíferos. No obstante, mientras que la tinción de Nissl mostró una característica apariencia redondeada o esférica, como corresponde a la dispersa estructura del retículo endoplasmático alrededor del núcleo de las neuronas cerebelares, la tinción con  $Cb_5R$  mostró una morfología más irregular y difusa en la zona periférica del soma neuronal, lo cual es consistente con la asociación existente entre  $Cb_5R$  y los rafts lipídicos de la membrana plasmática (Chatenay-Rivauday et al. 2004; Samhan-Arias et al. 2009; Marques-da-Silva et al. 2010; Samhan-Arias et al. 2012).

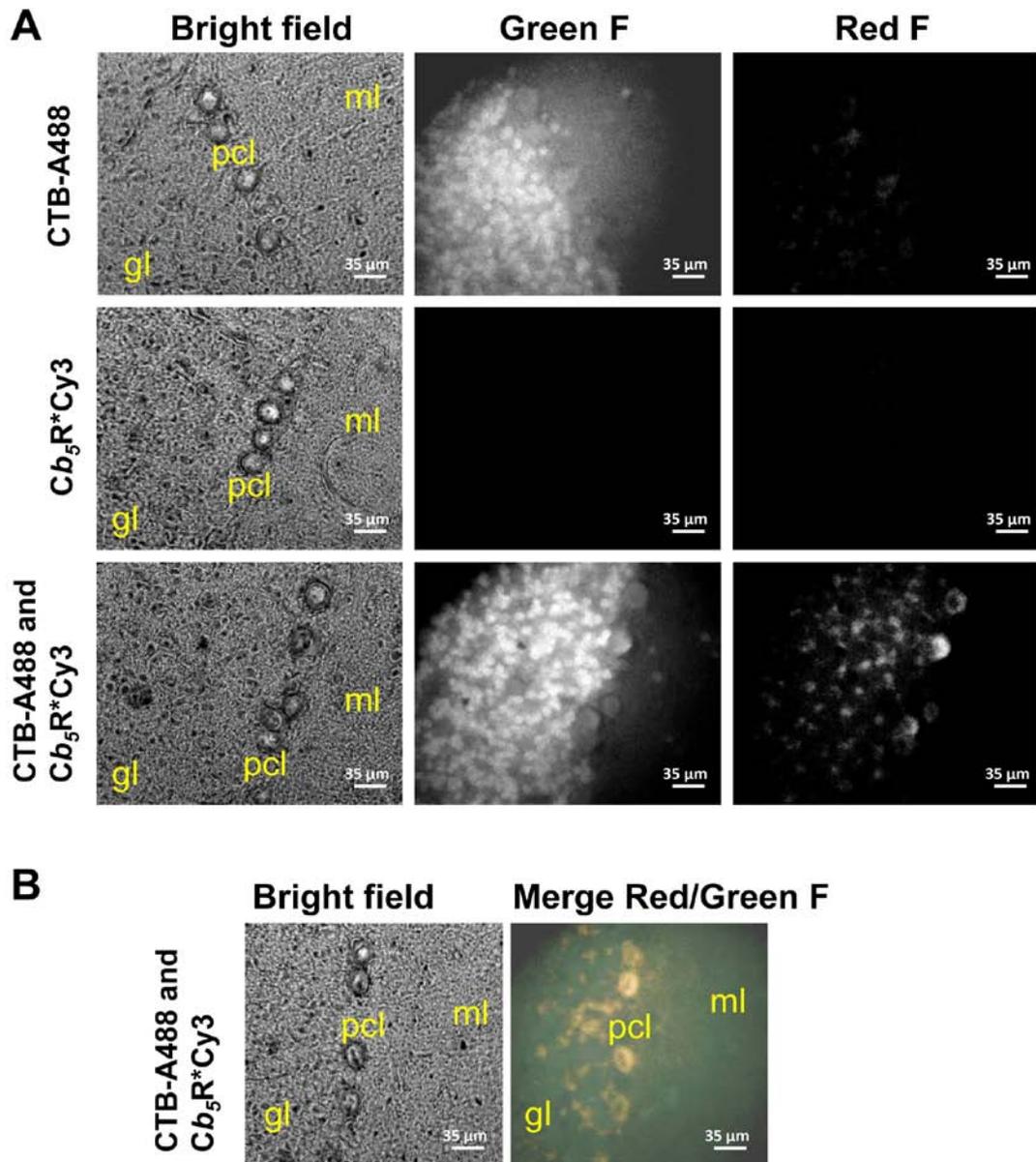
No obstante, esta hipótesis solo puede ser experimentalmente demostrada utilizando FRET, una técnica mediante la cual se ha puesto de manifiesto que los acúmulos de  $Cb_5R$  están asociados con rafts lipídicos de la membrana plasmática en cultivos de neuronas de la capa granular del cerebelo (Samhan-Arias et al. 2009, 2012). Por ello, hemos analizado experimentalmente este aspecto, utilizando FRET en secciones de cerebelo, mediante la aplicación de la toxina B del cólera marcada con fluorescencia, un marcador ampliamente utilizado para la detección de rafts lipídicos (Janes et al. 1999; O'Connell et al. 2004).

Utilizando microscopía de fluorescencia cuantitativa (Figura 19), hemos observado que la tinción de secciones de cerebelo con la toxina B del cólera Alexa488 marca preferentemente la capa granular (Figura 19A), y de manera poco intensa la capa molecular y la capa de células de Purkinje. Estos hallazgos son consistentes con la alta densidad de la red de rafts lipídicos de membrana plasmática observada en el soma de la capa granular del cerebelo cuando han sido estudiadas en cultivo (Samhan-Arias et al. 2009). Para completar los experimentos de FRET hemos utilizado la toxina B del cólera Alexa488 como donante y el complejo anti-isoforma 3- $Cb_5R$ /IgG-Cy3 como aceptador, para obtener el doble marcaje de las secciones de cerebelo.

Mediante este procedimiento hemos obtenido: (1) imágenes de secciones no teñidas, (2) imágenes de secciones tratadas con IgG-Cy3 en ausencia de preincubación con anti- $Cb_5R$  y (3) imágenes de secciones tras simple marcaje con toxina B del cólera Alexa488 o con anti- $Cb_5R$ /IgG-Cy3. Imágenes sin

fluorescencia como las mostradas para la fluorescencia verde y roja de secciones teñidas solamente con anti-*Cb<sub>5</sub>R*/IgG-Cy3 (Figura 19A) fueron también obtenidas en las secciones no teñidas y las secciones tratadas con IgG-Cy3 en ausencia de preincubación con anti-*Cb<sub>5</sub>R*.

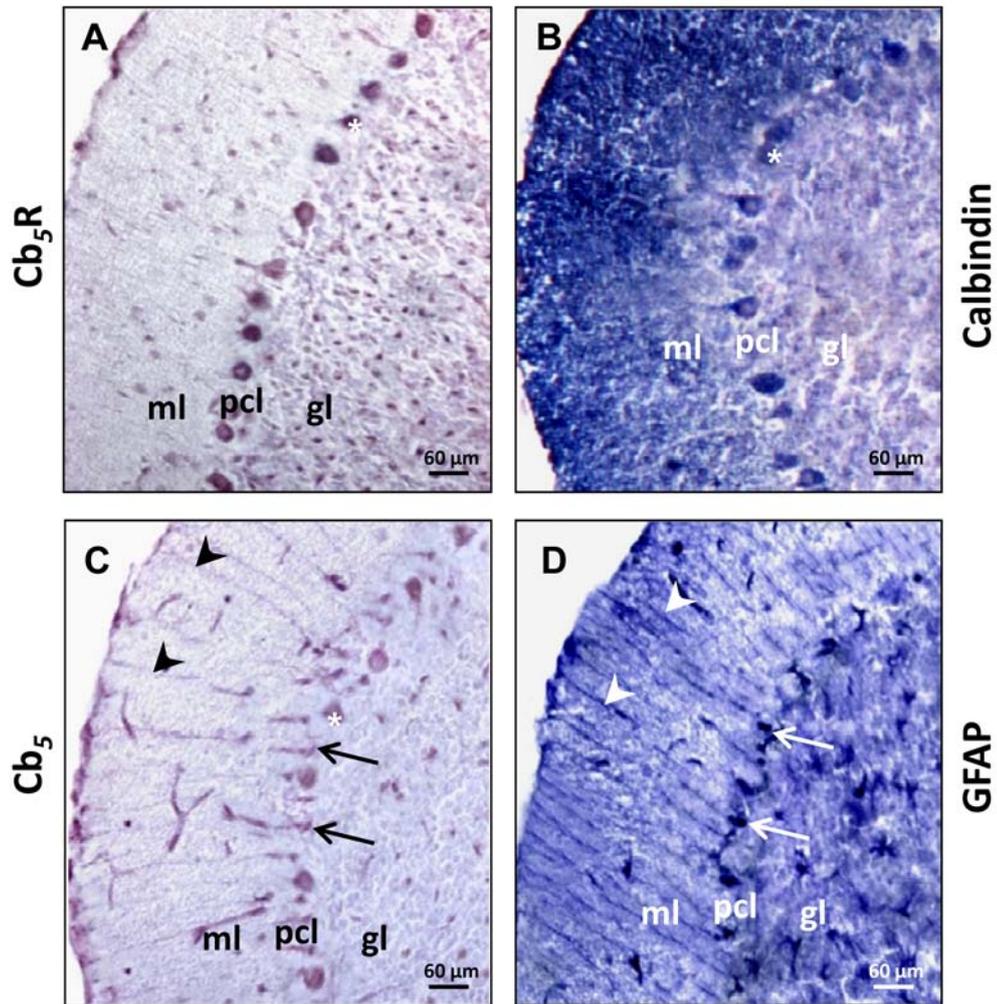
Estos datos en conjunto ponen de manifiesto que bajo nuestras condiciones de adquisición de imágenes de microscopía de fluorescencia, la autofluorescencia de los cortes cerebrales es insignificante, y que el tratamiento de la secciones solamente con el anticuerpo secundario fluorescente conjugado IgG-Cy3 no produce una señal significativa de fluorescencia de fondo. Además, la intensidad de fluorescencia verde y roja de las secciones teñidas solamente con anti-*Cb<sub>5</sub>R*/IgG-Cy3 es insignificante (Figura 19A). Así pues, el gran incremento de la fluorescencia roja observado con el doble marcaje con anti-*Cb<sub>5</sub>R*/IgG-Cy3 y la toxina B del cólera Alexa488 pone de manifiesto la presencia de FRET entre Alexa488 (donante FRET) y Cy3 (aceptador FRET). La superposición de imágenes (Figura 19B) pone de manifiesto el incremento de la intensidad de fluorescencia entre rojo y verde (marcado en naranja) a nivel del soma de las células de Purkinje, también observadas mediante esta técnica.



**Figura 19:** Una gran intensidad de  $Cb_5R$  se asocia con microdominios de acúmulos lipídicos en las células de Purkinje y las neuronas granulares en la corteza del cerebelo. A: Una parte de  $Cb_5R$  se expresa en la corteza cerebelosa, dentro de la distancia de FRET con sitios de unión de la toxina del cólera. Imágenes de microscopía de fluorescencia representan cuantitativamente cortes del cerebelo de 7 micras de espesor teñidos con la Alexa488 fluorescente conjugado de la toxina B del cólera (CTB-A488) y  $Cb_5R$  marcados con IgG-Cy3 ( $Cb_5R^*Cy3$ ). *Green F* y *Red F* significan imágenes de intensidad de fluorescencia verde y rojo, respectivamente. B: Zonas teñidas de amarillo-naranja combinadas con imágenes rojo / verde áreas de localización de CTB y  $Cb_5R$  isoforma 3 en cortes teñidos con CTB-A488 como donador de fluorescencia y  $Cb_5R^*Cy3$  como aceptor de fluorescencia. pcl: células de Purkinje, gl: granular, ml: molecular.

Para una precisa identificación de los cuerpos neuronales localizados entre las capas granular y molecular hemos realizado técnicas inmunocitoquímicas utilizando un anticuerpo marcador específico de las células de Purkinje (Celio, 1990; Dusart et al., 1997), anti-calbindina D28 K. Como hemos precisado anteriormente (Figura 1), tras la utilización del anti- $Cb_5R$ , hemos observado grandes somas neuronales alineados entre las capas granular y molecular de la corteza cerebelosa. Su localización, tamaño y morfología sugieren una elevada expresión de los niveles de  $Cb_5R$  en las células de Purkinje. Para precisar este importante aspecto, hemos obtenido imágenes de secciones teñidas con anti-calbindina D28 K (Figura 20), un característico marcador de las células de Purkinje. La comparación de las imágenes teñidas con anti-calbindina D28 K (Figura 20B) con las obtenidas utilizando anti- $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$  (Figura 20 A,C) ponen de manifiesto que las células de Purkinje están marcadas con ambos anticuerpos, manifestando niveles mucho más elevados que otras células presentes en la corteza cerebelosa.

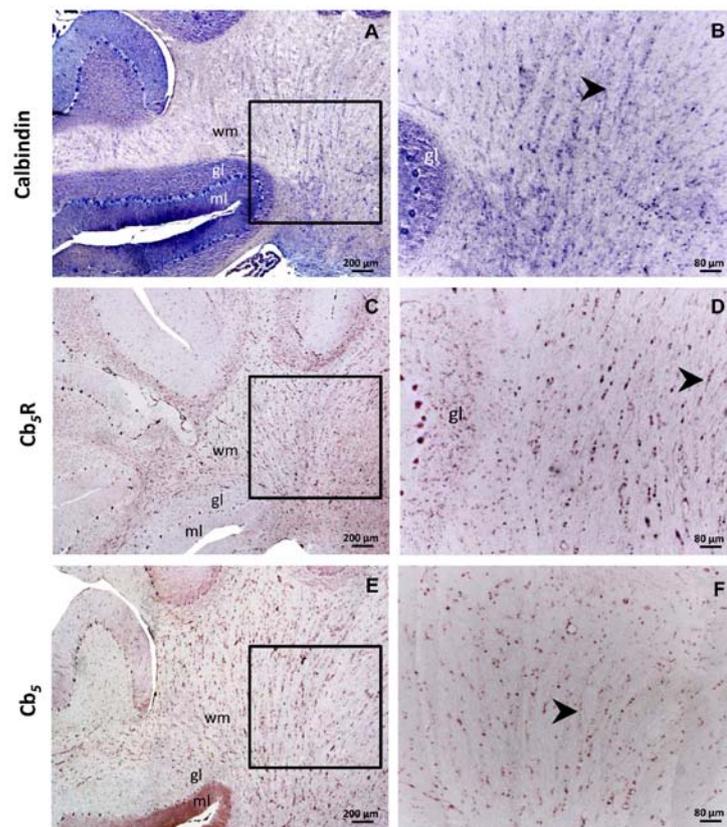
Además, hemos observado una distribución muy amplia de  $Cb_5$  de manera dispersa en la capa molecular, mostrando también señal en un patrón reticular localizado entre las células de Purkinje (Figura 20C). Ya que las células gliales de Bergmann modulan las células de Purkinje a través de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  (Wang et al., 2012), estableciendo así una precisa coordinación motora (Saab et al., 2012), hemos realizado también técnicas inmunocitoquímicas utilizando anti-GFAP, un marcador específico de las células de Bergmann (O'Callagan 1988; Nakamura y Uchihara 2004; Roda et al., 2008). El aspecto morfológico de la señal obtenida (Figura 20D), en comparación con las imágenes obtenidas con anti- $Cb_5$  (Figura 20C) sugiere que éste está también marcando intensamente los cuerpos y conexiones de las células gliales de Bergmann en íntima relación con los somas de las células de Purkinje.



**Figura 20:** Micrografías de la corteza cerebelosa tras inmunohistoquímica con anti-calbindina (A), anti- $Cb_5R$  (B), anti- $Cb_5$  (C) y anti-GFAP (D). Nótese el marcaje de los somas de las células de Purkinje (asteriscos) con anti- $Cb_5R$ , anti-calbindina y anti- $Cb_5$  en la capa de células de Purkinje (pcl). Anti-calbindin también marca las numerosas extensiones dendríticas de las células de Purkinje en la capa molecular (ml) y los axones en la capa granular (gl). Anti- $Cb_5$  y anti-GFAP marcan las conexiones de las células gliales de Bergman (puntas de flecha) en la capa molecular (ml) y el cuerpo (flechas) en la capa de células de Purkinje (pcl).

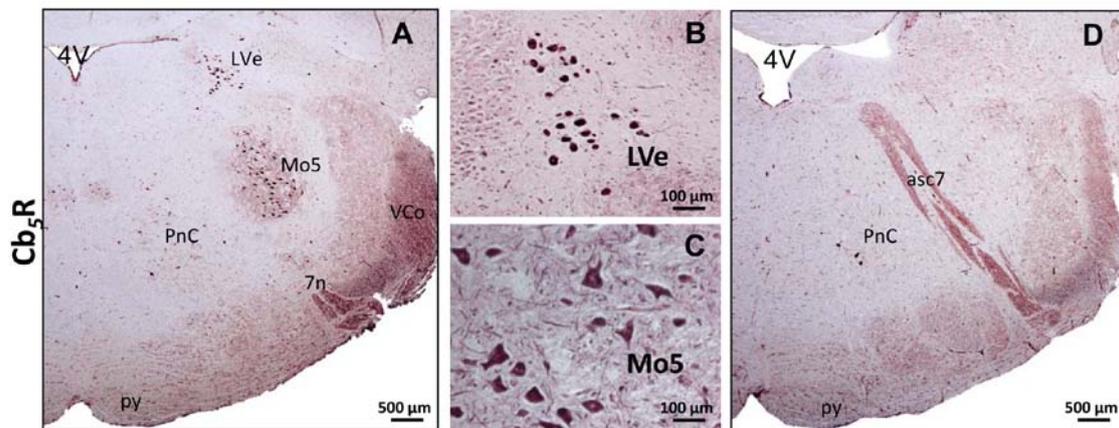
## Determinación del Sistema isoforma 3- $Cb_5R/Cb_5$ a nivel del tronco del encéfalo.

Es bien conocido que el axón de una célula de Purkinje se origina en el polo profundo del cuerpo neuronal, cruza la capa granular y alcanza la sustancia blanca cerebelosa. Estas proyecciones de las células de Purkinje, que son detectables con anticuerpos anti-calbindina D28 K, anti-  $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$  (Figura 21) llegan a conectar con los núcleos del cerebelo: fastigial, interpuesto y dentado, los cuales son también altamente marcados con anti-  $Cb_5R$ . Desde estos núcleos, las conexiones eferentes cerebelares se dirigen, entre otras estructuras del sistema nervioso, a los núcleos del tronco del encéfalo (Stephenson y Kushner 1988).

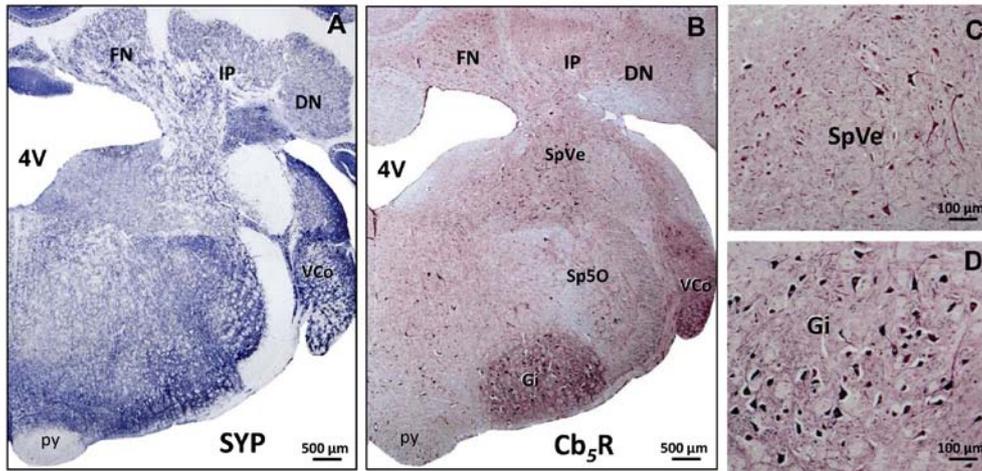


**Figura 21:** Micrografías ópticas de las secciones del cerebelo tras inmunohistoquímica con anti-calbindina (A y B), anti- $Cb_5R$  (C y D) y anti- $Cb_5$  (E y F). Las imágenes mostradas en los paneles B, D y F son magnificaciones de las áreas marcadas con un cuadrado en los paneles A, C y E, respectivamente. Nótese la reacción de axones de las células de Purkinje (puntas de flecha) con los tres anticuerpos en el nivel de la sustancia blanca del cerebelo (wm). ml: capa molecular. gl: capa granular.

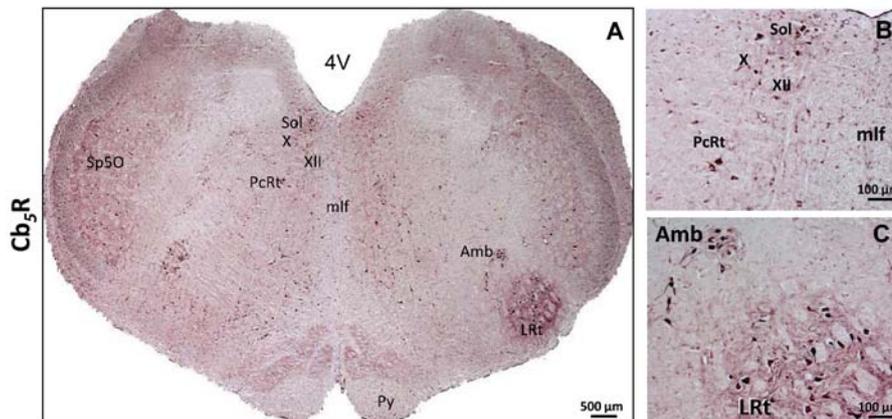
Las secciones del tronco del encéfalo analizadas mediante técnicas inmunocitoquímicas muestran altos niveles de expresión de  $Cb_5R$  en localizaciones motoras muy precisas del tronco del encéfalo. Tal como puede observarse en la figura 22, hemos detectado altos niveles de  $Cb_5R$  a nivel del núcleo motor del trigémino, núcleo del hipogloso, núcleo motor dorsal del nervio vago, núcleo espinal del trigémino, núcleo coclear ventral, así como la raíz del nervio facial (Figuras 22-24) entre otros.



**Figura 22:** Micrografías de secciones coronales a nivel del tronco del encéfalo (protuberancia) tras inmunohistoquímica con anti- $Cb_5R$ . Nótese la reacción (A) en las grandes neuronas (B) del núcleo vestibular lateral (LVe) y las grandes neuronas multipolares interpuestas con las células multipolares más pequeños (C) del núcleo motor del trigémino (Mo5). Una sección más caudal (D) muestra las fibras ascendentes del nervio facial (asc7) marcado con anti- $Cb_5R$ . PnC: núcleo reticular caudal pontino. VCo: núcleo coclear ventral. py: tracto piramidal. 7n: nervio facial (raíz del nervio facial). 4V: cuarto ventrículo.



**Figura 23:** Micrografías de secciones coronales del cerebelo y tronco del encéfalo tras técnicas inmunohistoquímica con anti-SYP (A) y anti- $Cb_5R$  (B-D). Nótese la reacción positiva a nivel de los núcleos cerebelosos: núcleo fastigial (FN), interpuesto (IP) y dentado (DN). Anti- $Cb_5R$  marca las neuronas del núcleo masticador del trigémino (Sp5O), así como el vestibular espinal (SpVe) y el núcleo reticular gigantocelular (Gi), entre otros (B). Nótese la reacción de anti-SYP y anti- $Cb_5R$  en el complejo de cito-arquitectura dentro del núcleo coclear ventral (VCo), que contiene diferentes tipos neuronales con características dendríticas distintas. A mayor aumento (C,D) se observan los somas en el núcleo vestibular espinal (SpVe) y las neuronas grandes multipolar en el núcleo reticular gigantocelular (Gi). py: tracto piramidal. 4V: cuarto ventrículo.



**Figura 24:** Micrografías de una sección coronal a nivel bulbo raquídeo tras la realización de técnicas inmunohistoquímica con anti- $Cb_5R$ . Nótese la reacción en el núcleo del tracto solitario (Sol), en el núcleo motor dorsal del vago (X), núcleo del hipoglosa (XII), núcleo masticador del trigémino (Sp5O), núcleo reticular parvocelular (PcRt), núcleo ambiguo (Amb) y núcleo reticular lateral (LRt), entre otros. A mayor aumento (B,C) se aprecia un detalle de estas estructuras: Sol, X, XII, y PcRt, así como los somas en LRt y las grandes neuronas motoras en Amb. py: tracto piramidal. 4V: cuarto ventrículo.

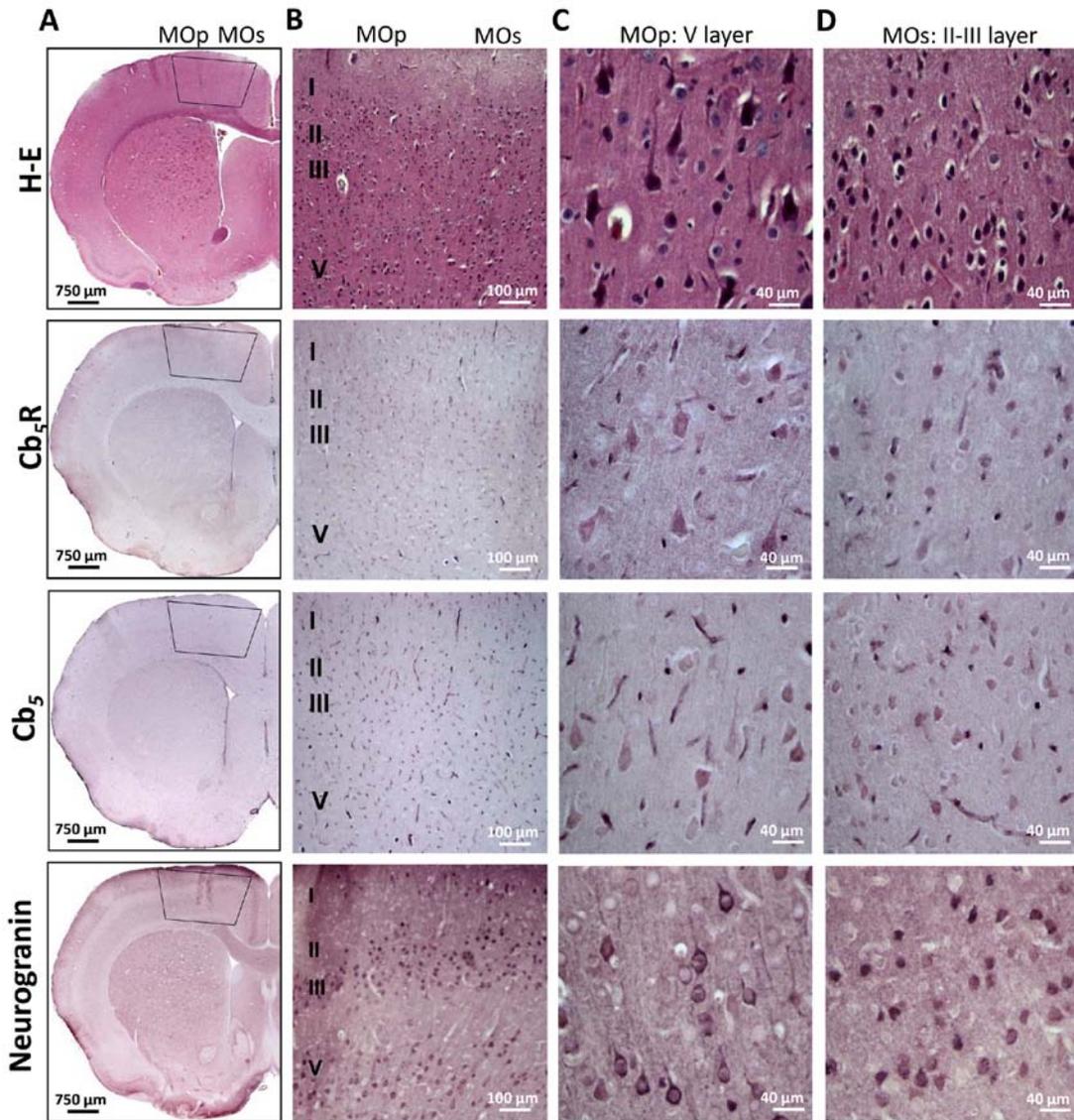


### **Determinación del Sistema isoforma 3-Cb<sub>5</sub>R/Cb<sub>5</sub> a nivel del cerebro.**

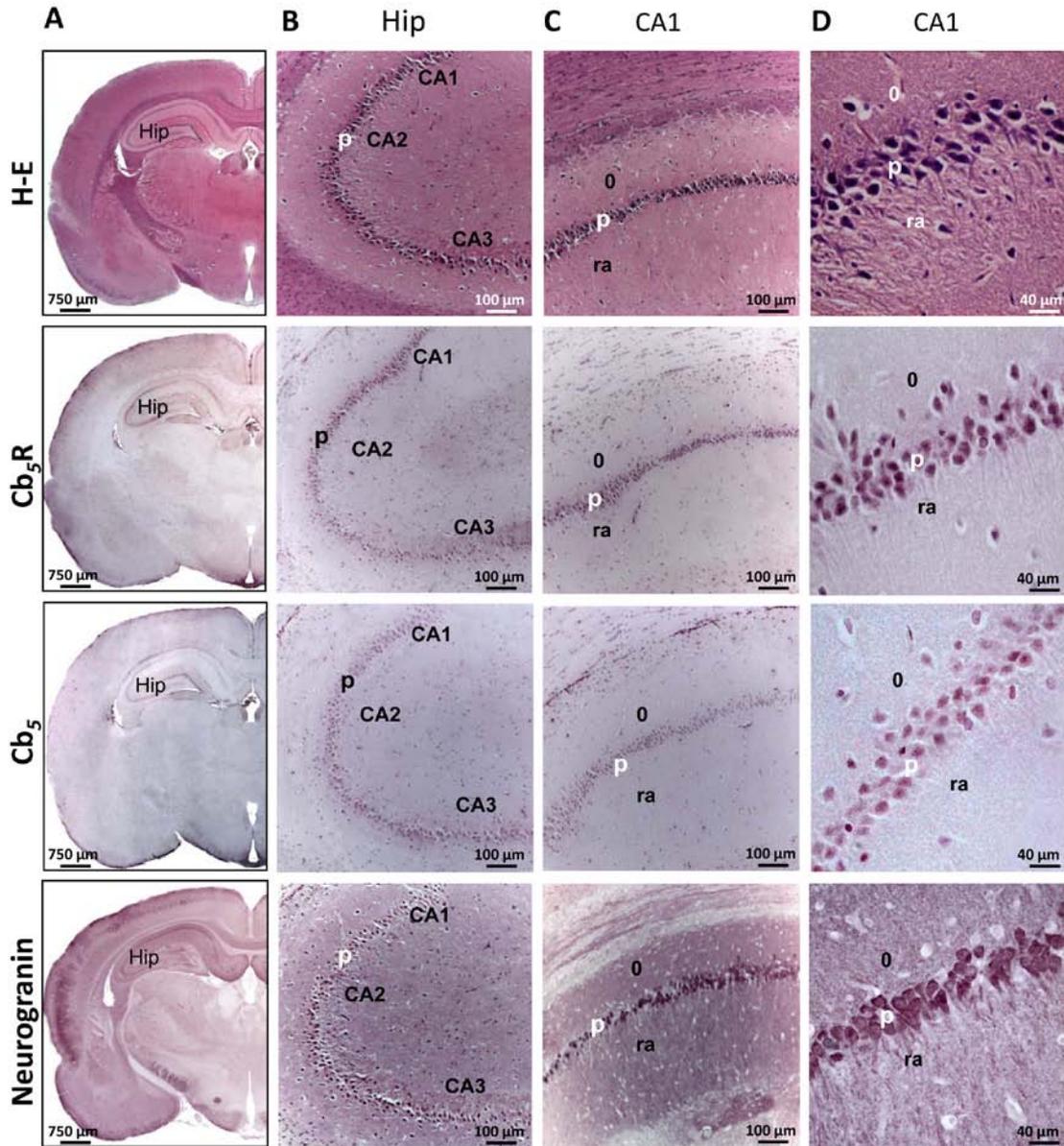
Nuestros resultados ponen de manifiesto que en el cerebro de rata las áreas que muestran mayor nivel de expresión de Cb<sub>5</sub>R y Cb<sub>5</sub> corresponden con la corteza cerebral frontoparietal y el hipocampo. Además, hemos realizado un estudio comparativo de la señal de Cb<sub>5</sub>R y Cb<sub>5</sub> en las grandes neuronas piramidales de estas áreas con la imagen obtenida a partir de la tinción de las secciones con antineurogranina, un marcador específico de neuronas piramidales (Represa et al., 1990).

Nuestros resultados revelan un patrón de tinción similar entre Cb<sub>5</sub>R/Cb<sub>5</sub> y neurogranina a nivel del neocortex cerebral en los somas de las células piramidales y sus ramificaciones dendríticas. Las observaciones con alta magnificación de las áreas motoras primarias y secundarias del neocortex frontoparietal ponen de manifiesto una elevada tinción de las neuronas piramidales con anti-Cb<sub>5</sub>R y anti-Cb<sub>5</sub> (Figura 25). Los altos niveles de expresión de Cb<sub>5</sub>R y Cb<sub>5</sub> en las neuronas gigantopiramiles (de Betz) de las áreas motoras primarias tienen una especial relevancia, ya que es bien conocido que estas neuronas presentan largos axones que llegan a sinaptar con las neuronas que constituyen los núcleos motores del tronco del encéfalo, anteriormente mencionados.

En nuestro estudio hemos observados altos niveles de expresión de Cb<sub>5</sub>R y Cb<sub>5</sub> a nivel del hipocampo, en las neuronas piramidales del asta de Ammón, en particular las neuronas piramidales del área CA1 (Figura 26). En este caso los somas de estas neuronas piramidales presentaron una mayor tinción que sus prolongaciones. La señal de Cb<sub>5</sub>R y Cb<sub>5</sub> es precaria a nivel de las dendritas basales (stratum oriens), aunque a nivel de las dendritas apicales (stratum radiatum) aparece una mayor señal de Cb<sub>5</sub>R en comparación con Cb<sub>5</sub>.



**Figura 25:** Micrografías de secciones coronales del cerebro tras la tinción de H&E e inmunohistoquímica con anti- $Cb_5R$ , anti- $Cb_5$  y anti-neurogranina, mostrando las áreas motoras de la corteza cerebral. En la columna A, un trapecio dibujado en negro marca las áreas motoras de la corteza cerebral de una sección frontoparietal del cerebro que se muestran con mayor detalle en las columnas B, C y D. La columna B muestra imágenes de las capas de las áreas motoras primaria y secundaria de la corteza cerebral en rata (MOp y MOs, respectivamente). La columna C muestra imágenes a mayor aumento de la capa V del área motora primaria (MOp), mostrando intensa tinción del soma de las neuronas piramidales gigantes con anti- $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$ . La columna D muestra imágenes de mayor aumento de las capas II-III del área motora secundaria (MOs), con intensa tinción del soma de las neuronas piramidales de esta capa.

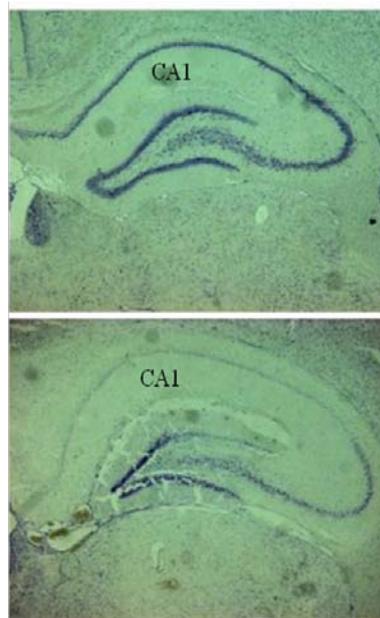


**Figura 26:** Micrografías de secciones coronales del cerebro tras tinción con H&E e inmunohistoquímica con anti-*Cb5R*, anti-*Cb5* y anti-neurogranina. En la columna A, Hp marca las áreas del hipocampo de un corte frontoparietal del cerebro que se muestra con mayores aumentos en las columnas B, C y D. La columna B muestra imágenes para visualizar la morfología general de cuerno de Ammon. La columna C muestra imágenes del campo piramidal CA1 (Cuerno de Ammon 1) del hipocampo y la columna D muestra imágenes a mayor aumento. La reacción es observable a nivel del soma de las células piramidales: p, capa piramidal. O, estrato oriens, ra, estrato radiado.

## Efecto de la administración de ácido 3-nitropropiónico (NPA)

Las ratas tratadas manifestaron importantes pérdidas de peso y, al tercer día de tratamiento, todas presentaban parálisis de las extremidades posteriores. Los efectos observados el último día de tratamiento fueron heterogéneos, registrándose mortalidad, masiva lesión cerebral y, en otros casos, lesiones extensas. Las ratas que sobrevivieron hasta el final del tratamiento se encontraban postradas, en recumbencia lateral o ventral, sin capacidad aparente para moverse y presentaron extensas lesiones cerebrales.

Los estudios realizados con estos grupos de ratas permitieron observar una clara correlación entre los síntomas neurológicos exhibidos por las ratas y las lesiones en el encéfalo. Las ratas con síntomas más ligeros no mostraban relevantes lesiones, o las lesiones estaban restringidas al estriado, mientras que los animales en recumbencia siempre mostraron amplias lesiones en el estriado y, de forma especialmente llamativa, en el hipocampo (Figura 27).



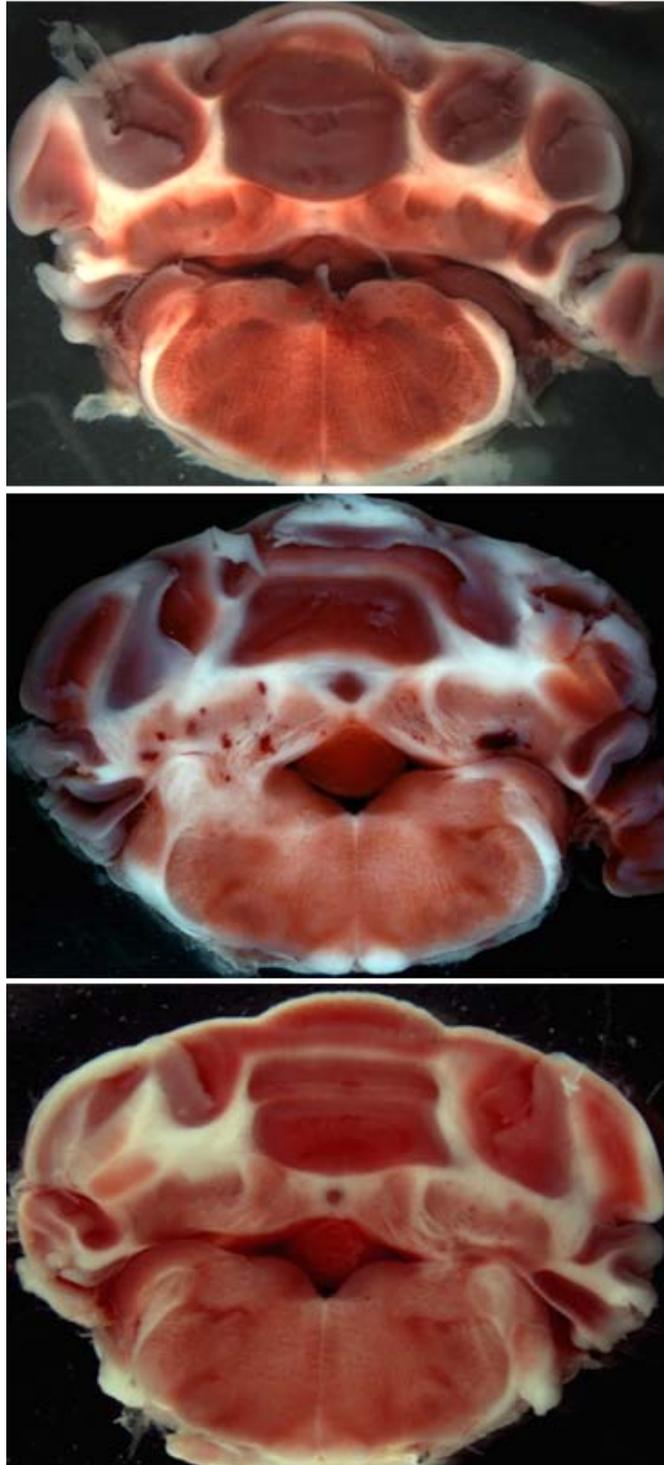
**Figura 27:** Lesión inducida por NPA en el área CA1 del hipocampo de rata. Las imágenes de microscopía óptica son representativas de cortes coronales de cerebro teñidos con el método de Nissl.

## **Neuroprotección con kaempferol.**

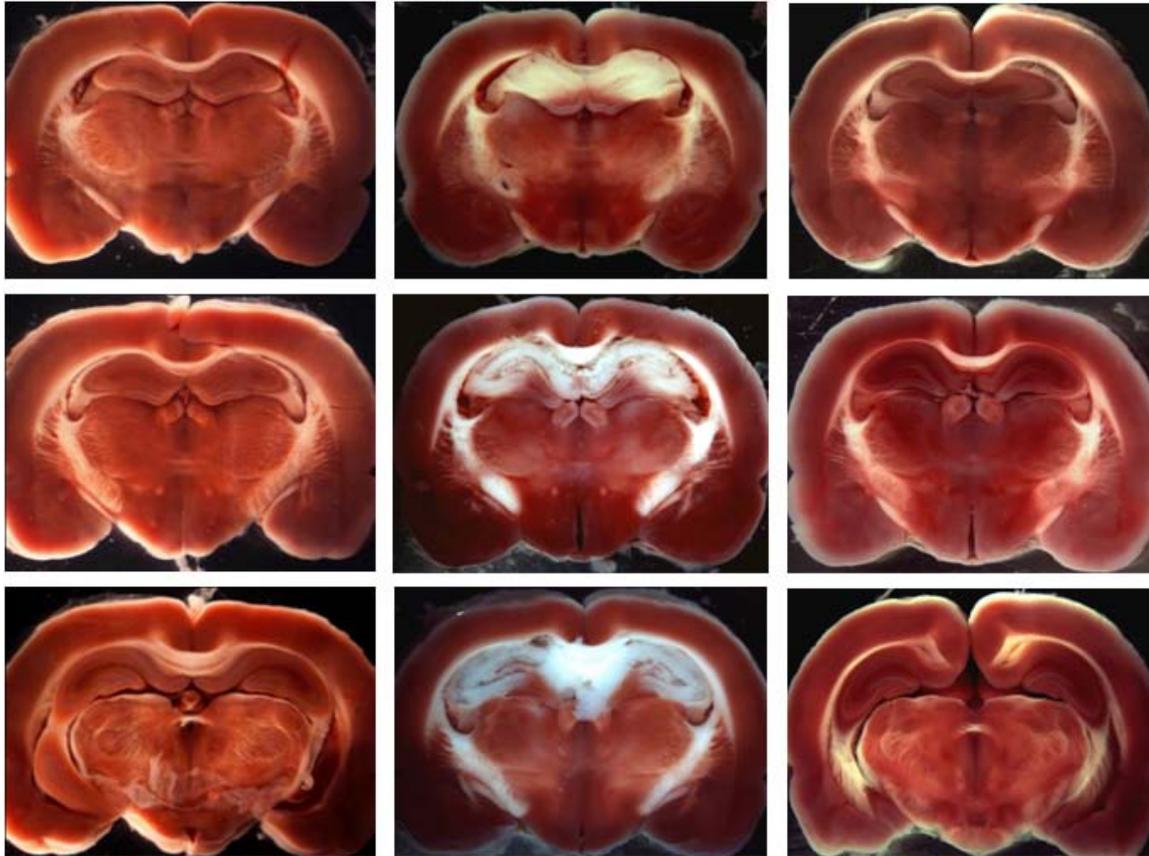
Tal como puede observarse en las figuras 28-32, la administración de NPA produce alteraciones significativas que afectan al cerebro, fundamentalmente a nivel del hipocampo, así como al cerebelo y al tronco del encéfalo.

Estas alteraciones neurodegenerativas se manifiestan mediante la utilización de diferentes técnicas, siendo evidente mediante la utilización del método del TTC (Figuras 28 y 29), así como tras las técnicas inmunocitoquímicas, utilizando, entre otros anticuerpos, el anti-Cb<sub>5</sub>R.

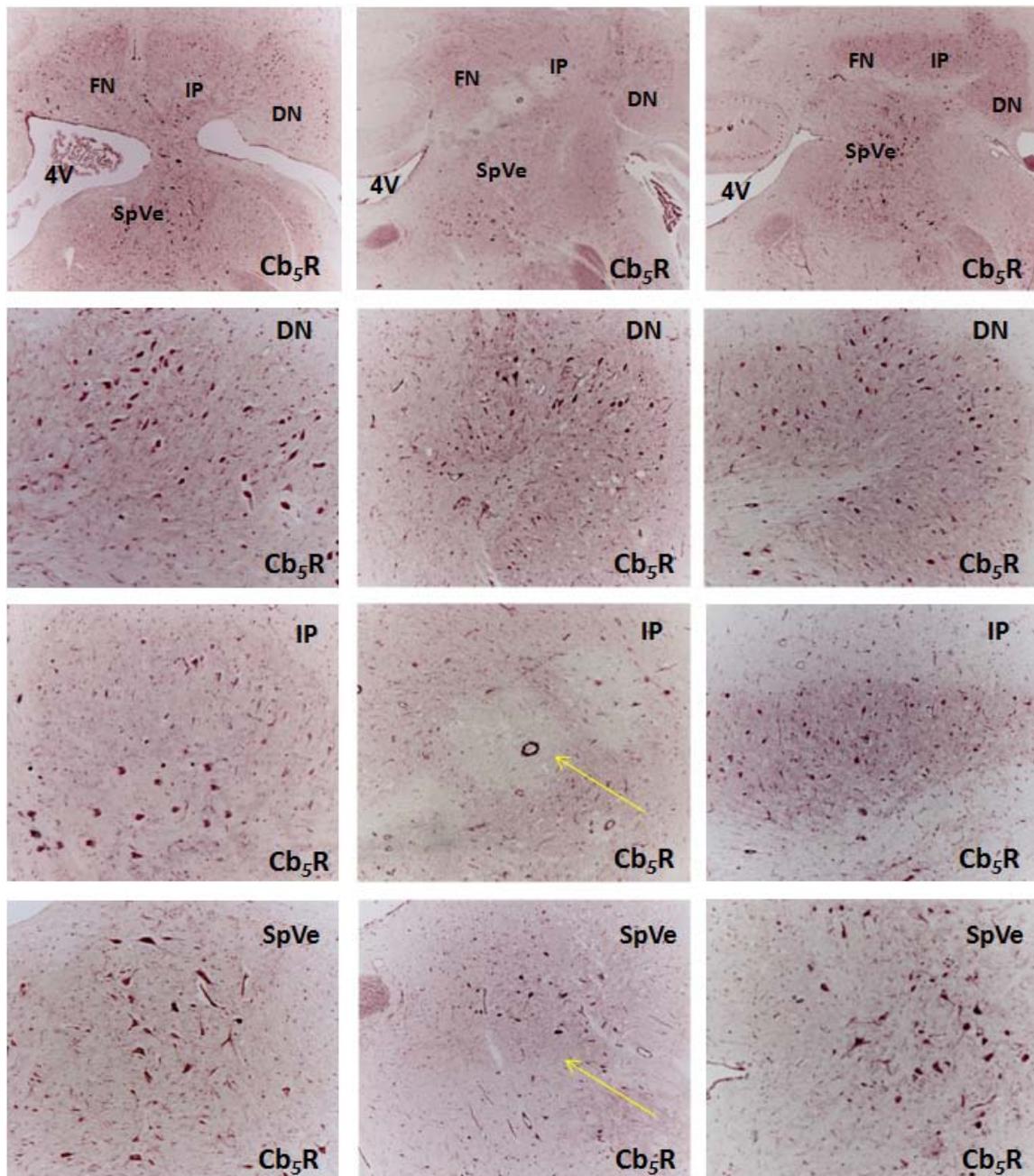
Las ilustraciones revelan el importante efecto neuroprotector conseguido mediante la administración de kaempferol. En estos encéfalos tratados con el flavonoide se aprecia una mayor resistencia a la lesión originada tras la administración de NPA, lo cual indica el relevante factor de neuroprotección empleado en nuestros experimentos.



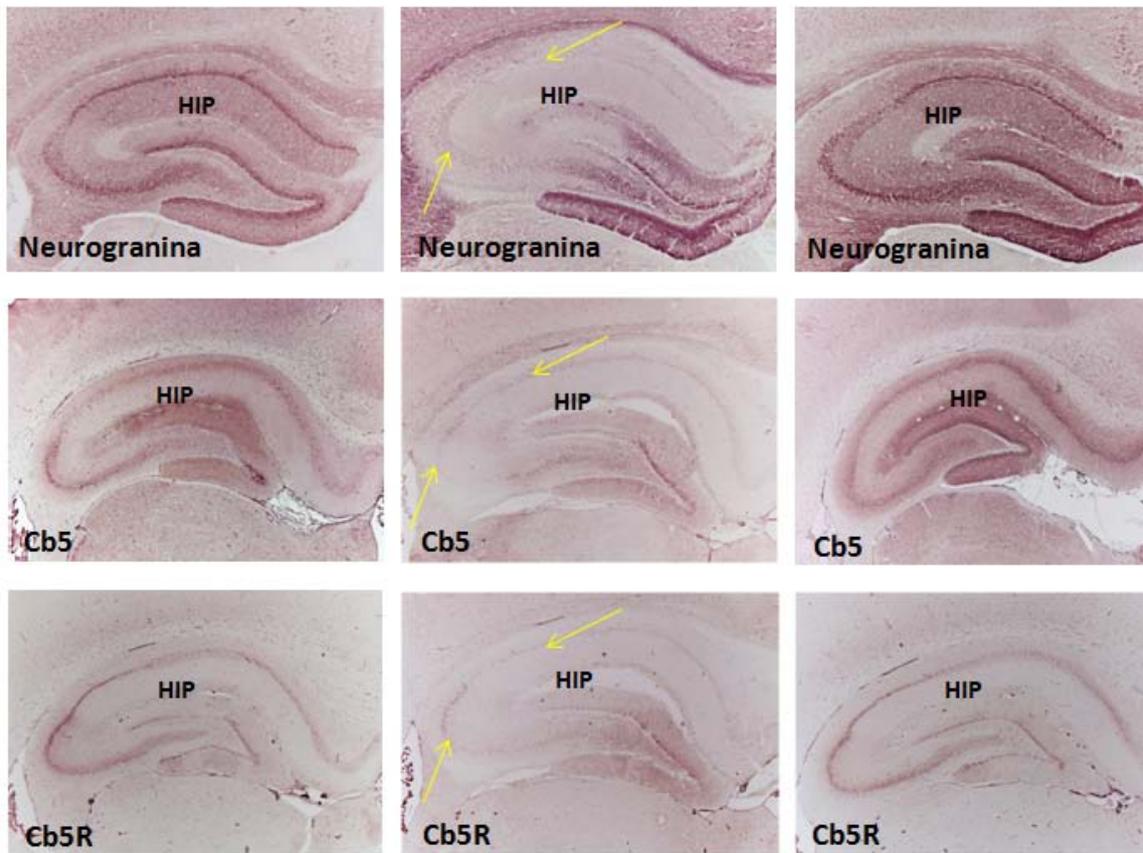
**Figura 28:** Secciones coronales que interesan al tronco del encéfalo y cerebelo tras la tinción con TTC. La imagen superior corresponde a una rata control. La imagen central corresponde a una de las tratadas con NPA, donde se puede apreciar la lesión, fundamentalmente a nivel de los núcleos del cerebelo, y las lesiones hemorrágicas concomitantes. La imagen inferior muestra la notable protección que evidencia la administración de kaempferol.



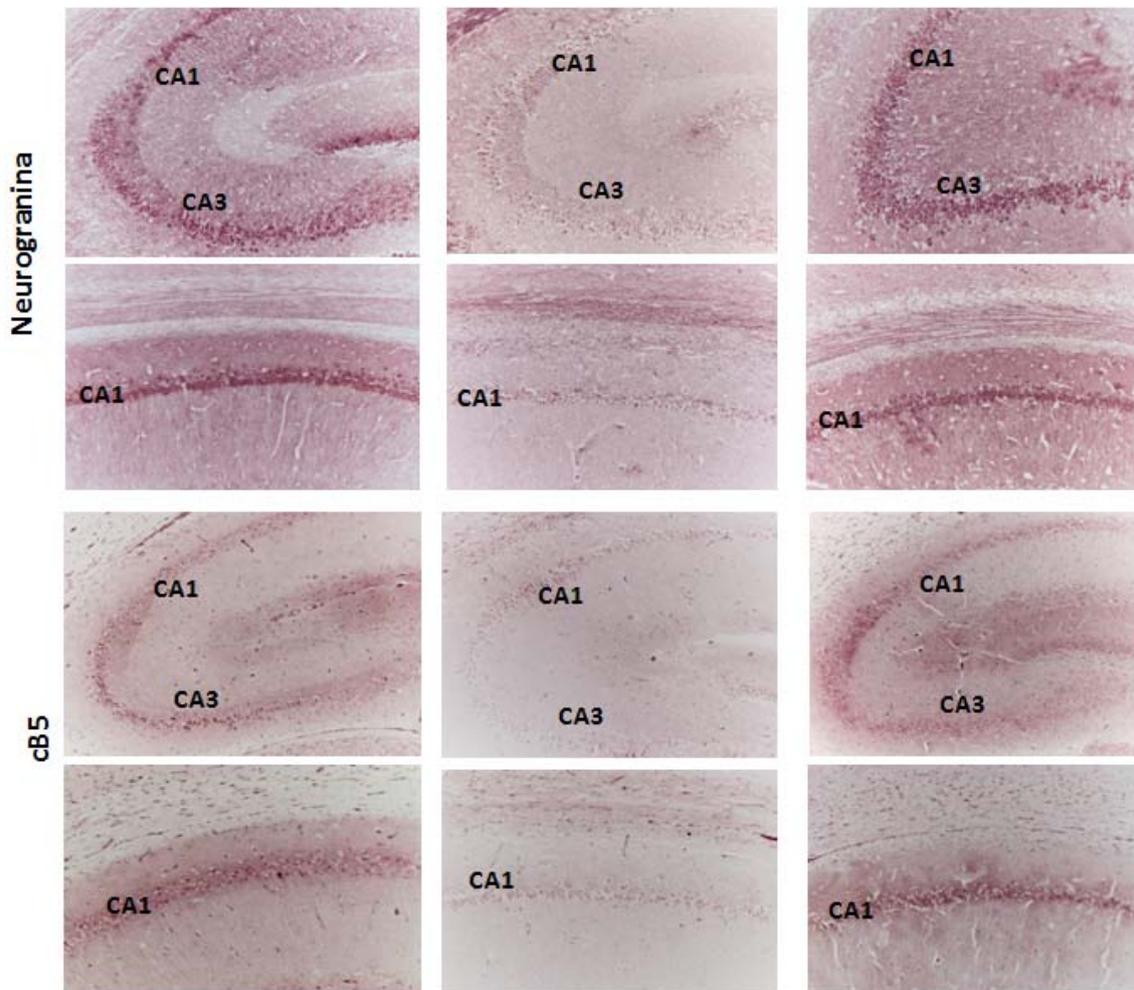
**Figura 29:** Secciones coronales que interesan al cerebro tras la tinción con TTC. La columna izquierda corresponde a una rata control. La columna central corresponde a una de las tratadas con NPA, donde se puede apreciar la lesión, fundamentalmente a nivel del hipocampo. La columna derecha muestra la notable protección que evidencia la administración de kaempferol.



**Figura 30:** Secciones coronales que interesan al tronco del encéfalo y cerebelo tras inmunohistoquímica con anticuerpo anti-Cb<sub>5</sub>R. La columna izquierda corresponde a una rata control. La columna central corresponde a una de las tratadas con NPA, donde se puede apreciar la disminución de la expresión de los niveles de Cb<sub>5</sub>R. La columna derecha muestra la notable protección que evidencia la administración de kaempferol.



**Figura 31:** Secciones coronales del cuerno de Ammon tras inmunohistoquímica con anticuerpos anti-neurogranina y anti- $Cb_5R$ . La columna izquierda corresponde a una rata control. La columna central corresponde a una de las tratadas con NPA, donde se puede apreciar la disminución (flechas) de la expresión de los niveles de neurogranina y  $Cb_5R$  a nivel del hipocampo (HIP). La columna derecha muestra la notable protección que evidencia la administración de kaempferol.



**Figura 32:** Secciones coronales del cuerno de Ammon (áreas CA1, CA2 y CA3) tras inmunohistoquímica con anticuerpos anti-neurogranina y anti- $Cb_5$ . La columna izquierda corresponde a una rata control. La columna central corresponde a una de las tratadas con NPA, donde se puede apreciar la disminución de la expresión de los niveles de neurogranina y  $Cb_5$  a nivel del hipocampo (áreas CA1, CA2 y CA3). La columna derecha muestra la notable protección que evidencia la administración de kaempferol.

## **DISCUSIÓN**



Los altos niveles de expresión de  $Cb_5R$  y de  $Cb_5$  que hemos descrito en las neuronas piramidales de los núcleos motores del tronco del encéfalo, así como de las áreas motoras del neocortex cerebral y del hipocampo, constituyen novedosos hallazgos que añaden importantes datos al conocimiento de la actividad funcional del cerebro, que juegan un papel crucial en las funciones neuroanatómicas y fisiológicas del cerebro. En consecuencia la alteración de este sistema entraría a formar parte de las bases fisiopatológicas que determinan la muerte neuronal por estrés oxidativo característica de las enfermedades neurodegenerativas que cursan con severas alteraciones motoras neurológicas.

Además, hemos observado en las células de Purkinje, que juegan un papel importante integrador en las respuestas eferentes del cerebelo, altos niveles de expresión del sistema  $Cb_5R/Cb_5$ . Estos datos sugieren que el deterioro funcional o degenerativo de estas células constituye posiblemente algunas de las bases que determinan la disfunción del cerebelo y los déficits neurológicos asociados a ciertas patologías, por ejemplo, en la metahemoglobinemia tipo II congénita recesiva, originada por mutaciones de  $Cb_5R$ .

En nuestros resultados también mostramos elevados niveles de estas proteínas en las neuronas de la capa granular del cerebelo, lo cual está en consonancia con los resultados obtenidos analizando neuronas granulares en cultivos *in vitro*, tal como se ha puesto de manifiesto previamente en trabajos llevados a cabo en nuestros laboratorios.

De nuestro estudio se desprende que:

i) A nivel de la capa molecular hay una mayor reacción frente al anticuerpo anti- $Cb_5$  que frente al anti- $Cb_5R$ , en particular a nivel de la red que establecen las conexiones de las células gliales de Bergmann. Además, el elevado marcaje con anti-SYP a nivel de esta capa molecular indica la presencia de un elevado número de conexiones sinápticas, una característica de las múltiples estructuras

dendríticas de las células de Purkinje, identificadas por su marcador específico, anti-calbindina D28 K.

ii) Los somas de las células de Purkinje localizados entre las capas molecular y granular se tiñen intensamente con su marcador específico anti-calbindina D28 K, así como con ambos anticuerpos, anti- $Cb_5R$  y anti- $Cb_5$ .

iii) A nivel de la capa granular se aprecia una intensa tinción con anti- $Cb_5R$ , imagen que se superpone con las obtenidas mediante la tinción de las células granulares con la técnica de Nissl, así como, aunque con menor intensidad la señal con anti- $Cb_5$ . Además, esta capa granular contiene las prolongaciones axonales de las células de Purkinje así como sus ramas colaterales recurrentes, evidenciado por las tinciones con anti-calbindina D28 K y anti-SYP.

Teniendo en cuenta los datos presentados, nuestros resultados sugieren que el complejo enzimático  $Cb_5R/Cb_5$  está altamente implicado en la función de las neuronas que juegan un papel principal en el control de las conexiones eferentes a nivel de la corteza cerebelosa. De este modo, los elevados niveles de ambas proteínas en esta localización serían responsables de la modulación de los impulsos neuronales eferentes.

Es bien conocido que la formación reticular recibe información precisa de los núcleos del cerebelo, principalmente del núcleo fastigial. Nuestros resultados muestran que  $Cb_5R$  está altamente expresado en las neuronas gigantocelulares que constituyen el núcleo reticular pontino caudal, responsable del control de los movimientos involuntarios asociados con la masticación, y el bruxismo (Sasaki et al., 2004). Además, estos altos niveles de  $Cb_5R$  a nivel del núcleo reticular pontino caudal sugiere una correlación funcional con la distonía generalizada y las alteraciones del movimiento descrita en pacientes que sufren una metahemoglobinemia congénita recesiva tipo II (Leroux et al., 1975; Toelle et al., 2004; Percy y Lappin 2008; Ewencyk et al., 2008; Huang et al., 2012).

Este patrón de expresión de  $Cb_5R$  y  $Cb_5$  a nivel del soma y dendritas, a nivel del neocortex y del hipocampo podrían representar un aspecto clave en la

plasticidad sináptica, determinando un posible papel en la modulación de la actividad neuronal de estas áreas de cerebro, particularmente en los casos propensos a la degeneración neuronal por envejecimiento y a la enfermedad de Alzheimer. Estos indicios podrían estar apoyados por recientes estudios en los que prestan especial atención al sorprendente nivel de precisión mostrado por la sinapsis en el neocortex y en el hipocampo, en particular, el sistema GABAérgico inhibitorio de las células piramidales juega un papel clave en la señalización de la regulación neuronal del  $\text{Ca}^{2+}$  (Higley 2014).

Es de especial relevancia que el sistema  $\text{Cb}_5\text{R}/\text{Cb}_5$  juega también un papel clave en el metabolismo lipídico, crítico para la actuación y mantenimiento de la plasticidad neuronal asociada con una evada actividad sináptica. Además, la isoforma 3-Cb5R unida a la membrana plasmática cataliza la reacción NADH dependiente, reciclando los radicales libres de ascorbato a ascorbato, el mayor antioxidante extracelular en el cerebro. Así pues, las células de Purkinje y las neuronas granulares del cerebelo mostrarían actividad y capacidad funcional para contrarrestar el estrés oxidativo tisular, proceso que estaría alterado en las mutaciones de  $\text{Cb}_5\text{R}$ , dando lugar a la pérdida de función de estas proteínas y por ello determinando una mayor propensión a la degeneración.

La neurodegeneración causada por NPA en roedores presenta características similares a la observada en la HD, y los modelos de degeneración estriatal inducida por la neurotoxina constituyen modelos animales de la enfermedad.

La neurotoxicidad del NPA ha sido asociada al incremento en la producción mitocondrial de ROS (Lee et al. 2002; Liot et al. 2009). El NPA estimula la liberación de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por mitocondrias de cerebro, un fenómeno que es potentemente inhibido por el flavonoide kaempferol. Ya que estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado efectos protectores muy relevantes del kaempferol en modelos de neurodegeneración asociados a estrés oxidativo (Samhan-Arias et al. 2004; López- Sánchez et al. 2007), planteamos estudiar el potencial neuroprotector de este flavonoide contra la neurotoxicidad del NPA en

rata, poniéndose de manifiesto su importante papel como elemento de protección del sistema redox  $Cb_5R/Cb_5$ .

## **CONCLUSIONES**



De los trabajos desarrollados en la presente Tesis Doctoral, cuyos resultados han sido contrastados y analizados con la bibliografía al respecto, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1.- Los elevados niveles de expresión de  $Cb_5R$  y de  $Cb_5$  que hemos observado en la corteza cerebelosa, en las neuronas piramidales de los núcleos motores del tronco del encéfalo, así como de las áreas motoras del neocortex cerebral y del hipocampo, constituyen novedosos hallazgos que añaden importantes datos al conocimiento de la actividad funcional del encéfalo.

2.- Nuestros resultados acerca de las alteraciones del sistema  $Cb_5R/Cb_5$  inducidas por el ácido nitropropiónico sugieren que el deterioro neuronal funcional y/o degenerativo constituye posiblemente alguna de las bases que determinan la disfunción del encéfalo y los déficits neurológicos asociados a ciertas patologías neurodegenerativas.

3.- Ante las evidencias obtenidas tras la administración de kaempferol, mostrando efectos de neuroprotección neuronal en las áreas estudiadas, es asumible que una administración controlada de flavonoides en la dieta sería de gran efecto preventivo y terapéutico frente a las enfermedades neurodegenerativas.

4.- Los óptimos hallazgos obtenidos tras los diferentes procedimientos experimentales, reflejados previamente *in vitro* y en nuestro estudio en encéfalo de rata adulta, inducen a extender este tipo de estudios para la aplicabilidad en los pacientes con enfermedades neurodegenerativas.

5.- Dado que nuestra Comunidad Autónoma de Extremadura es altamente productora de alimentos ricos en antioxidantes naturales, sería una puerta abierta a la explotación de los mismos, apoyándose para su distribución y empleo en una base científica.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Aalfs CM, Salieb-Beugelaar GB, Wanders RJA, Mannens MMAM, Wijburg FA (2000) A case of methemoglobinemia type II due to NADH-cytochrome b5 reductase deficiency: determination of the molecular basis. *Hum. Mutat.* 16:18–22
- Borgese N, D'Arrigo A, De Silvestris M, Pietrini G (1993) NADH-cytochrome b5 reductase and cytochrome b5 isoforms as models for the study of post-translational targeting to the endoplasmic reticulum. *FEBS Letters* 325:70-75
- Canu N, Calissano P (2003) In vitro cultured neurons for molecular studies correlating apoptosis with events related to Alzheimer disease. *The Cerebellum* 2:270-278
- Celio MR (1990) Calbindin-D28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35:375-475
- Chatenay-Rivauday C, Cakar ZP, Jenö P, Kuzmenko ES, Fiedler K (2004) Caveolae: biochemical analysis. *Mol. Biol. Rep.* 31:67-84
- Contestabile A (2002) Cerebellar granule cells as a model to study mechanisms of neuronal apoptosis or survival in vivo and in vitro. *The Cerebellum* 1:41-55
- Crane FL, Sun IL, Crowe RA, Alcain FJ, Low H (1994) Coenzyme Q10, plasma membrane oxidase and growth control. *Mol. Aspects Med.* 15 Suppl: s1-11
- Dikranian K, Qin YQ, Labruyere J, Nemmers B, Olney JW (2005) Ethanol-induced neuroapoptosis in the developing rodent cerebellum and related brain stem structures. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 155:1-13
- Dougherty SE, Reeves JL, Lucas EK, Gamble KL, Lesort M, Cowell RM (2012) Disruption of Purkinje cell function prior to huntingtin accumulation and cell loss in an animal model of Huntington Disease. *Exp. Neurol.* 236:171-178
- Dusart I, Airaksinen MS, Sotelo C (1997) Purkinje cell survival and axonal regeneration are age dependent: an in vitro study. *J. Neurosci.* 17:3710-3726

- Elrick MJ, Pacheco CD, Yu T, Dadga N, Shakkottai VG, Ware C, Paulson HL, Lieberman AP (2010) Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* 19:837-847
- Ewencyk C, Leroux A, Roubergue A, Laugel V, Afenjar A, Saudubray JM, Beauvais P, Billette de Villemeur T, Vidailhet M, Roze E (2008) Recessive hereditary methaemoglobinemia, type II: delineation of the clinical spectrum. *Brain* 131:760-761
- Fujita M, Kadota T, Sato T (1996) Developmental profiles of synaptophysin in granule cells of rat cerebellum: an immunohistochemical study. *J. Electron. Microsc.* 45:185-194
- Girard M, Larivière R, Parfitt DA, Deane EC, Gaudet R, Nossova N, Blondeau F, Prenosil G, Vermeulen EG, Duchon MR, Richter A, Shoubridge EA, Gehring K, McKinney RA, Brais B, Chapple JP, McPherson PS (2012) Mitochondrial dysfunction and Purkinje cell loss in autosomal recessive spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (ARSACS). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:1661-1666
- Harrison FE, May JM (2009) Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. *Free Radic. Biol. Med.* 46:719-730
- Higley MJ (2014) Localized GABAergic inhibition of dendritic Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* 15:567-572
- Hildebrandt A, Estabrook RW (1971) Evidence for the participation of cytochrome b<sub>5</sub> in hepatic microsomal mixed-function oxidation reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* 143:66–79
- Hourez R, Servais L, Orduz D, Gall D, Millard I, de Kerchove d'Exaerde A, Cheron G, Orr HT, Pandolfo M, Schiffmann SF (2011) Aminopyridines correct early dysfunction and delay neurodegeneration in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 1. *J. Neurosci.* 31:11795-11807
- Huang Y, Tai C, Lu Y, Wu TJ, Chen H, Niu D (2012) Recessive congenital methemoglobinemia caused by a rare mechanism: Maternal uniparental heterodisomy with segmental isodisomy of a chromosome 22. *Blood Cells Mol. Dis.* 49:114–117

- Hultquist DE, Passon PG (1971) Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase. *Nat. New Biol.* 229:252–254
- Janes PW, Ley SC, Magee AI (1999) Aggregation of lipid rafts accompanies signalling via the T cell antigen receptor. *J. Cell Biol.* 147:447–461
- Jeffcoat R, Brawn PR, Safford R, James AT (1977) Properties of rat liver microsomal stearyl-coenzyme A desaturase. *Biochem. J.* 161:431–437
- Kasumu A, Bezprozvanny I (2012) Deranged Calcium Signaling in Purkinje Cells and Pathogenesis in Spinocerebellar Ataxia 2 (SCA2) and Other Ataxias. *Cerebellum* 11:630-639
- Kawata S, Trzaskos JM, Gaylor JL (1985) Microsomal enzymes of cholesterol biosynthesis from lanosterol. Purification and characterization of delta 7-sterol 5-desaturase of rat liver microsomes. *J. Biol. Chem.* 260:6609-6617
- Lagoa R, López-Sánchez C, Samhan-Arias AK, Gañán CM, García-Martínez V, Gutierrez-Merino C (2009) Kaempferol protects against rat striatal degeneration induced by 3-nitropropionic acid. *J. Neurochem.* 111:473-487
- Leroux A, Junien C, Kaplan J, Bambenger J (1975) Generalised deficiency of cytochrome b5 reductase in congenital methaemoglobinaemia with mental retardation. *Nature* 258:619-620
- López-Sánchez C, Martín-Romero FJ, Sun F, Luis L, Samhan-Arias AK, García-Martínez V, Gutierrez-Merino C (2007) Blood micromolar concentrations of kaempferol afford protection against ischemia/reperfusion-induced damage in rat brain. *Brain Res.* 1182:123-137
- Marques-da-Silva D, Samhan-Arias AK, Tiago T, Gutierrez-Merino C (2010) L-type calcium channels and cytochrome b5 reductase are components of protein complexes tightly associated with lipid rafts microdomains of the neuronal plasma membrane. *J. Proteomics* 73:1502-1510

- Marques-da-Silva D, Gutierrez-Merino C (2012) L-type voltage-operated calcium channels, N-methyl-D-aspartate receptors and neuronal nitric oxide synthase form a calcium/redox nano-transducer within lipid rafts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420:257-262
- Marques-da-Silva D, Gutierrez-Merino C (2014) Caveolin-rich lipid rafts of the plasma membrane of mature cerebellar granule neurons are microcompartments for calcium/reactive oxygen and nitrogen species cross-talk signaling. *Cell Calcium* 56:108-123
- Martin-Romero FJ, Garcia-Martin E, Gutierrez-Merino C (2002) Inhibition of oxidative stress produced by plasma membrane NADH oxidase delays low-potassium-induced apoptosis of cerebellar granule cells. *J. Neurochem.* 82:705-715
- May JM (1999) Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane? *FASEB J.* 13:995-1006
- Nakamura A, Uchihara T (2004) Dual enhancement of triple immunofluorescence using two antibodies from the same species. *J. Neurosci. Methods* 135:67–70
- O'Callagan JP (1988) Neurotypic and gliotypic proteins and biochemical markers of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* 10:445-452
- O'Connell KMM, Martens JR, Tamkun MM (2004) Localization of ion channels to lipid raft domains within the cardiovascular system. *Trends Cardiovasc. Med.* 14:37–42
- Paine MG, Che G, Li M, Neumar RW (2012) Cerebellar Purkinje cell neurodegeneration after cardiac arrest: Effect of therapeutic hypothermia. *Resuscitation* 83:1511-1516
- Percy MJ, Lappin TR (2008) Recessive congenital methaemoglobinaemia: cytochrome b5 reductase deficiency. *British Journal of Haematology* 141:298-308
- Pilati N, Barker M, Panteleimonitis S, Donga R, Hamann M (2008) A rapid method combining Golgi and Nissl staining to study neuronal morphology and cytoarchitecture. *J. Histochem. Cytochem.* 56:539-550
- Represa A, Deloulme JC, Sensenbrenner M, Ben-Ari Y, Baudier J (1990) Neurogranin: immunocytochemical localization of a brain-specific protein kinase C substrate. *J Neurosci.* 10:3782-3792

- Rioux V, Pédrone F, Legrand P (2011) Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1811:1-8
- Roda E, Coccini T, Acerbi D, Castoldi A, Bernocchi G, Manzo L (2008) Cerebellum cholinergic muscarinic receptor (subtype-2 and -3) and cytoarchitecture after developmental exposure to methylmercury: an immunohistochemical study in rat. *J. Chem. Neuroanat.* 35:285-294
- Saab AS, Neumeyer A, Jahn HM, Cupido A, Šimek AA, Boele HJ, Scheller A, Le Meur K, Götz M, Monyer H, Sprengel R, Rubio ME, Deitmer JW, De Zeeuw CI, Kirchhoff F (2012) Bergmann glial AMPA receptors are required for fine motor coordination. *Science* 337:749-753
- Samhan-Arias AK, Martín-Romero FJ, Gutierrez-Merino C (2004) Kaempferol blocks oxidative stress in cerebellar granule cells and reveals a key role for reactive oxygen species production at the plasma membrane in the commitment to apoptosis. *Free Radical Biol. Med.* 37:48-61
- Samhan-Arias AK, Duarte RO, Martín-Romero FJ, Moura JJ, Gutierrez-Merino C (2008) Reduction of ascorbate free radical by the plasma membrane of synaptic terminals from rat brain. *Arch. Biochem. Biophys.* 469:243-254
- Samhan-Arias AK, Garcia-Bereguian MA, Martín-Romero FJ, Gutierrez-Merino C (2009) Clustering of plasma membrane-bound cytochrome b5 reductase within 'lipid raft' microdomains of the neuronal plasma membrane. *Mol. Cell. Neurosci.* 40:14-26
- Samhan-Arias AK, Marques-da-Silva D, Yanamala N, Gutierrez-Merino C (2012) Stimulation and clustering of cytochrome b5 reductase in caveolin-rich lipid microdomains is an early event in oxidative stress-mediated apoptosis of cerebellar granule neurons. *J. Proteomics* 75:2934-2949
- Samhan-Arias AK, Gutierrez-Merino C (2014a) Purified NADH-cytochrome b5 reductase is a novel superoxide anion source inhibited by apocynin: sensitivity to nitric oxide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 73:174-189

- Samhan-Arias AK, Gutierrez-Merino C (2014b) Cytochrome b<sub>5</sub> as a pleiotropic metabolic modulator in mammalian cells, in “Cytochromes b and c: Biochemical properties, biological functions and electrochemical analysis”, Chapter 2, pp. 39-80. Editor Rurik Thom, editorial Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, USA.
- Samhan-Arias AK, López-Sánchez C, Marques-da-Silva D, Lagoa R, Garcia-Lopez V, García-Martínez V, Gutierrez-Merino C (2015) High expression of cytochrome b<sub>5</sub> reductase isoform 3/cytochrome b<sub>5</sub> system in the cerebellum and pyramidal neurons of adult rat brain. *Brain Struct. Funct.* En Prensa.
- Sasaki S, Yoshimura K, Naito K (2004) The neural control of orienting: role of multiple-branching reticulospinal neurons. *Prog. Brain Res.* 143:383-389
- Schenkman JB, Jansson I (2003) The many roles of cytochrome b<sub>5</sub>. *Pharmacol. Ther.* 97:139–152
- Stephenson DT, Kushner PD (1988) An atlas of a rare neuronal surface antigen in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* 8:3035-3056
- Storbeck KH, Swart AC, Lombard N, Adriaanse CV, Swart P (2012) Cytochrome b<sub>5</sub> forms homomeric complexes in living cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 132:311-321
- Taft JR, Vertes RP, Perry GW (2005) Distribution of GFAP+ astrocytes in adult and neonatal rat brain. *Int. J. Neurosci.* 115:1333-1343
- Toelle SP, Boltshauser E, Mossner E et al (2004) Severe neurological impairment in hereditary methaemoglobinemia type 2. *Eur. J. Pediatr.* 163:207–209
- Valencia A, Moran J (2001) Role of oxidative stress in the apoptotic cell death of cultured cerebellar granule neurons. *J. Neurosci. Res.* 64:284-297
- Vieira LM, Kaplan JC, Kahn A, Leroux A (1995) Four new mutations in the NADH-cytochrome b<sub>5</sub> reductase gene from patients with recessive congenital methemoglobinemia type II. *Blood* 85:2254-2262

Villalba JM, Navarro F, Gómez-Díaz C, Arroyo A, Bello RI, Navas P (1997) Role of cytochrome b5 reductase on the antioxidant function of coenzyme Q in the plasma membrane. *Mol. Aspects Med.* 18:Suppl. S7-S13

Wang F, Xu Q, Wang W, Takano T, Nedergaard M (2012) Bergmann glia modulate cerebellar Purkinje cell bistability via  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^{+}$  uptake. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:7911-7916

# DOCUMENTO DE ACTIVIDADES

## Documento de actividades

Nombre y Apellidos: Virginio GARCÍA LÓPEZ

Documento de Identificación: 80091215V

### Publicaciones:

1. Lopez-Sanchez, C., **Garcia-Lopez, V.**, Mijares, J., Domínguez, J.A., Sanchez-Margallo, F.M., Alvarez, I.S., y Garcia-Martinez, V. (2013).

Gastrulación: Proceso clave en la formación de un nuevo organismo.

*Revista de Embriología Clínica y Biología de la Reproducción. Revista ASEBIR, 18: 29-41.*

2. Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., **Garcia-Lopez, V.**, Aranega, A., and Garcia-Martinez, V. (2015).

Negative Fgf8-Bmp2 feed-back is regulated by miR-130 during early cardiac specification. *Developmental Biology, 406: 63-73.*

3. Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., **Garcia-Lopez, V.**, Aranega, A., and Garcia-Martinez, V. (2015).

Reciprocal repression between Fgf8 and miR-133 regulates cardiac induction through Bmp2 signaling.

*Data in Brief, 5: 59-64.*

4. Lopez-Sanchez, C., **Garcia-Lopez, V.**, Schoenwolf, G.C., and Garcia-Martinez, V. (2016).

From epiblast to mesoderm: elaboration of a fate map for cardiovascular progenitors.

In: ESC Textbook of Cardiovascular Development Tracker (Perez-Pomares JM, Kelly R, eds.).

Oxford University Press.

Chapter 4. pp.42-51.

*In Press.*

5. Samhan-Arias, A.K., López-Sánchez, C., Marques-da-Silva, D., Lagoa, R., **Garcia-Lopez, V.**, García-Martínez, V. and Gutierrez-Merino, C. (2015).

High expression of cytochrome  $b_5$  reductase isoform 3/cytochrome  $b_5$  system in the cerebellum and pyramidal neurons of adult rat brain.

*Brain Structure and Function. In Press.*

6. Samhan-Arias, A.K., López-Sánchez, C., Marques-da-Silva, D., Lagoa, R., **Garcia-Lopez, V.**, García-Martínez, V. and Gutierrez-Merino, C. (2015).

An improved FRET technique for cytochrome  $b_5$  reductase/cytochrome  $b_5$  system observation in cerebral slices.

*Data in Brief.*

*Submitted.*

7. Lopez-Sanchez, C., **Garcia-Lopez, V.**, Porras, L., and Garcia-Martinez, V. (2016).

Skin incisions, head and neck soft-tissue dissection.

In: Operative Cranial Neurosurgical Anatomy (Galliardi, J, ed.).

Thieme Publishers. NY. USA

Chapter 2. pp.16-29.

*In Press.*

## Asistencia a Congresos

- 1.-** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Aranega, A., **Garcia-Lopez, V.**, Bonet, F., Garcia-Martinez, V.  
A role for miR-130 regulating FGF-BMP feed back in cardiogenesis.  
*2<sup>nd</sup> Meeting of the Portuguese Society for Developmental Biology.*  
Lisbon.  
24-26 Octubre 2.013.
- 2.-** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Aranega, A., Ortiz, A., **Garcia-Lopez, V.**, Bonet, F., Garcia-Martinez, V.  
Interaction between Bmp2 and miR-133 during early chick cardiac development.  
*X Meeting of the Spanish Society for Developmental Biology.*  
Madrid.  
13-15 Octubre 2.014.
- 3.-** Franco, D., Bonet, F., Lopez-Sanchez, C., **Garcia-Lopez, V.**, Ortiz, A., Aranega, A., Garcia-Martinez, V.  
A role for miR-15, miR-23, miR-106 and miR-199 during cardiogenesis and somitogenesis in the developing chick.  
*X Meeting of the Spanish Society for Developmental Biology.*  
Madrid.  
13-15 Octubre 2.014.
- 4.-** **Garcia-Lopez, V.**, Uson-Gargallo, J., Sanchez-Margallo, F.  
Plan de Formación del Servicio de Farmacia en el Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*  
*XIX Congreso Nacional Farmacéutico.*  
Córdoba.  
22-24 Octubre 2.014.
- 5.-** **Garcia-Lopez, V.**, Uson-Gargallo, J., Sanchez-Margallo, F.  
Nuevos retos en Atención Primaria ante la prescripción por Graduados en Ciencias de la Salud: Enfermeros, Podólogos y Fisioterapeutas.  
Plan de Formación.  
*XIX Congreso SEFAP Sociedad Española de Farmacéuticos de Atención Primaria.*  
Mérida. Badajoz.  
29-31 Octubre 2.014.
- 6.-** Samhan-Arias, A.K., López-Sánchez, C., Marques-da-Silva, D., Lagoa, R., **Garcia-Lopez, V.**, García-Martínez, V. Gutierrez-Merino, C.  
Immunolocalization of cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase/cytochrome *b<sub>5</sub>* system in adult rat cerebellum.  
*XVIII Congress of the Portuguese Biochemical Society.*  
Coimbra. Portugal.  
17-20 Diciembre 2.014.
- 7.-** **Garcia-Lopez, V.**, López-Sánchez, C., Samhan-Arias, A.K., Lagoa, R., Marques-da-Silva, D., García-Martínez, V. Gutierrez-Merino, C.  
Experimental analysis of the neuroprotective effects of antioxidants: preliminary study of cytochrome *b<sub>5</sub>* reductase isoform3/cytochrome *b<sub>5</sub>* system.  
*INFARMA. Congreso Europeo de Farmacia.*  
Barcelona. España.  
24-26 Marzo 2.015
- 8.-** **Garcia-Lopez, V.**, Uson-Gargallo, J., Sanchez-Margallo, F.  
Sistemas de formación en Farmacia Comunitaria desde el Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón.*  
*INFARMA. Congreso Europeo de Farmacia.*  
Barcelona. España.  
24-26 Marzo 2.015
- 9.** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., **Garcia-Lopez, V.**, Aranega, A., Garcia-Martinez, V.  
miR-130 regulates a negative Fgf8-Bmp2 feed-back loop during early cardiac specification.  
*3<sup>rd</sup> Meeting of the Portuguese Society for Developmental Biology. Jointly with the Spanish and British Societies for Developmental Biology.*  
Algarve. Portugal.  
7-10 Octubre 2.015
- 10.** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., **Garcia-Lopez, V.**, Aranega, A., Garcia-Martinez, V.  
Fgf8 and miR-133 regulate cardiac induction through control of Bmp2 signaling.  
*3<sup>rd</sup> Meeting of the Portuguese Society for Developmental Biology. Jointly with the Spanish and British Societies for Developmental Biology.*  
Algarve. Portugal.  
7-10 Octubre 2.015
- 11.** Sanz-Ezquerro, J.J., Uribe, V., **Garcia-Lopez, V.**, Garcia-Martinez, V., Lopez-Sanchez, C.  
Arid3b regulates the endothelial-specific miR-126 expression during early chick vascular development.  
*3<sup>rd</sup> Meeting of the Portuguese Society for Developmental Biology. Jointly with the Spanish and British Societies for Developmental Biology.*  
Algarve. Portugal.  
7-10 Octubre 2.015
- 12.** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., Dueñas, A., Aranega, A., **Garcia-Lopez, V.**, Ortiz, A., Garcia-Martinez, V.  
MicroRNAs with specific roles during early developing chick angiogenesis.  
*3<sup>rd</sup> Meeting of the Portuguese Society for Developmental Biology. Jointly with the Spanish and British Societies for Developmental Biology.*  
Algarve. Portugal.  
7-10 Octubre 2.015  
Poster.
- 13.** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., **Garcia-Lopez, V.**, Aranega, A., Garcia-Martinez, V.  
Negative Fgf8-Bmp2 feed-back is regulated by miR-130 during early cardiac specification.  
*Cardiovascular Development Conference. Academic Medical Center, Department of Anatomy, Embryology and Physiology and European Society of Cardiology, Working Group on Development, Anatomy and Pathology.*  
Amsterdam. Holanda.  
4-6 Noviembre 2.015
- 14.** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., **Garcia-Lopez, V.**, Aranega, A., Garcia-Martinez, V.  
Reciprocal repression between Fgf8 and miR-133 regulates cardiac induction through Bmp2 signaling.  
*Cardiovascular Development Conference. Academic Medical Center, Department of Anatomy, Embryology and Physiology and European Society of Cardiology, Working Group on Development, Anatomy and Pathology.*  
Amsterdam. Holanda.  
4-6 Noviembre 2.015
- 15.** Sanz-Ezquerro, J.J., Uribe, V., **Garcia-Lopez, V.**, Garcia-Martinez, V., Lopez-Sanchez, C.  
Angiomir-126 expression is regulated by Arid3b during early chick vascular development.  
*Cardiovascular Development Conference. Academic Medical Center, Department of Anatomy, Embryology and Physiology and European Society of Cardiology, Working Group on Development, Anatomy and Pathology.*  
Amsterdam. Holanda.  
4-6 Noviembre 2.015
- 16.** Lopez-Sanchez, C., Franco, D., Bonet, F., Dueñas, A., Aranega, A., **Garcia-Lopez, V.**, Ortiz, A., Garcia-Martinez, V.  
Specific roles for miR-15, miR-199, miR-23, miR-130 and miR-106 during early developing chick angiogenesis.  
*Cardiovascular Development Conference. Academic Medical Center, Department of Anatomy, Embryology and Physiology and European Society of Cardiology, Working Group on Development, Anatomy and Pathology.* Amsterdam. Holanda. 4-6 Noviembre 2.015

## Becas de Investigación

Becario. Cluster de la Salud.  
Farmacéutico.

1 de Noviembre de 2.013 - 16 de Abril de 2.014.

## Estancias en otras Universidades

Laboratorio de la Dra. Holgado Villafuerte. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica.  
Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.

1 de Septiembre de 2.013 – 30 Octubre de 2.013.

## Cursos impartidos

**1.- *Fármacos en Reproducción Asistida.***

0,15 créditos.

Curso de Especialista Universitario en Reproducción Asistida. 2013-2014.  
Universidad de Extremadura.

**2.- III *Practicum* ASEBIR de Micromanipulación (ICSI y ASSISTED HATCHING).**

Docencia Práctica.

13-14 marzo 2.014.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**3.- *Magister* en Reproducción Humana Asistida. SEF.**

Docencia Práctica.

21-22 marzo 2.014.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**4.- *El Deporte. Buen aliado contra el tabaco y las drogas.***

I Seminario Deportivo *Sport Meet Capital*.

3 octubre 2.014

*Alzyra*. Badajoz.

**5.- *Introducción. Historia. Definición de Producto Cosmético.***

I Curso en Dermofarmacia y Cosmética.

14-15 noviembre 2.014.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**6.- *Legislación de Producto Cosméticos.***

I Curso en Dermofarmacia y Cosmética.

14-15 noviembre 2.014.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**7.- *II Curso de Formación para personal investigador en Ciencias Biomédicas y usuarios de animales de experimentación Categoría C.***

Docencia Práctica.

14 Enero a 27 de Febrero de 2.015.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**8.- *Legislación de Producto Cosméticos.***

II Curso en Dermofarmacia y Cosmética.

22-23 mayo 2.015.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**9.- *Interacciones farmacológicas y Efectos secundarios.***

I Curso de Farmacología Aplicada a Podólogos.

19 Junio – 19 Julio 2.015.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**10.- *La correcta pauta farmacológica: Caso Clínico.***

I Curso de Farmacología Aplicada a Podólogos.

19 Junio – 19 Julio 2.015.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

**11.- *Fármacos. Contraindicaciones y precauciones: Caso Clínico.***

I Curso de Farmacología Aplicada a Podólogos.

19 Junio – 19 Julio 2.015.

Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*. Cáceres.

## Cursos recibidos

- 1.- Curso de Fisiopatología y Tratamiento de la Infertilidad: Fármacos en Reproducción Asistida. 20h.  
Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*.  
Cáceres 12-14 Marzo 2.013.
- 2.- CURSO INICIATIVA EMPRENDEDORA EOI. Emprendedor Universitario. Procesos de Innovación en el Emprendimiento. Escuela de Negocios.  
Facultad de Ciencias Económicas y Empresariales. Badajoz.  
DIPLOMA MÓDULO INICIATIVA EMPRENDEDORA.  
150h.  
Universidad de Extremadura.  
Badajoz 14 Octubre – 18 Noviembre 2.013.
- 3.- Curso de Inmunohistoquímica Básica. Prof. Eugenio Leonardo.  
Dpto. Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina. Universidad de Extremadura.  
10h.  
Badajoz 6-8 Diciembre 2.013.
- 4.- FundeSalud.  
Derechos y Deberes de los Pacientes en el Marco de la Responsabilidad Sanitaria. 2013.  
1,5 Créditos.  
Centro de Cirugía de Mínima Invasión *Jesús Usón*.  
Cáceres 16-17 Diciembre 2.013.
- 5.- FundeSalud.  
Gestión Sanitaria. 2014.  
1 Crédito.  
Hospital Universitario Infanta Cristina.  
Badajoz 20-21 Enero 2014.
- 6.- Usuario de Animales en la Experimentación en Ciencias Biomédicas. Categoría B: Capacitación para la realización de los Experimentos.  
40 horas.  
Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura.  
Cáceres. 5-18 Junio 2014.
- 7.- Teórico-Práctico sobre novedades en formulación pediátrica, dermatológica y oftalmológica.  
2,5 Créditos.  
Colegio Oficial de Farmacéuticos de Cáceres.  
Cáceres. 9-11 Marzo 2015.

## Otros méritos (Idiomas, premios, menciones,...)

- 1.- Premio al mejor Expediente en el Máster Universitario en Investigación en Ciencias de la Salud. Curso 2.013/2.014.
- 2.- Habilitación Profesional.  
Categoría B: Personal vinculado a animales de experimentación que lleva a cabo los procedimientos. Capacitación para la realización de los Experimentos.  
23 Junio 2.014.
- 3.- Miembro del Grupo de Investigación Catalogado:  
Grupo de Investigación de Centro de Cirugía de Mínima Invasión.  
BBB012  
Investigador Principal: Dr. Francisco Miguel Sánchez Margallo
- 4.- Participación en Proyecto de Investigación:  
Título del Proyecto: Desregulación de sistemas de transporte de calcio y redox asociados a “rafts” en neuronas por marcadores moleculares en la degeneración cerebral y la búsqueda de neuroprotectores.  
Subvencionado por Ministerio de Economía y Competitividad.  
Programa Estatal de Investigación Científica y Técnica de Excelencia  
BFU2014-53641-P  
2015/2018  
Investigadores Principales: Dra. Ana M<sup>a</sup> Mata Durán, Dr. Carlos Gutiérrez Merino