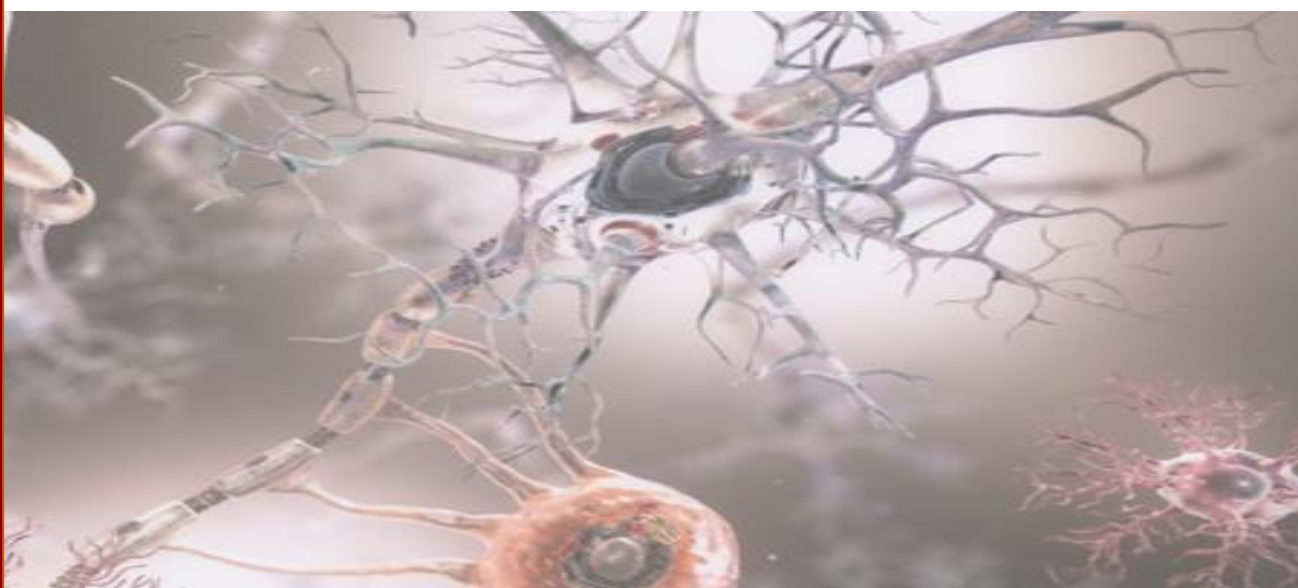


**EFFECTOS DEL TRATAMIENTO COMBINADO DE
VERAPAMILO Y CURCUMINA EN LA INFLAMACIÓN
MICROGLIAL**

María Marco Aisa

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



Tutora académica: Dra Carmen Portillo, Dep. Bioquímica y Biotecnología,
carmen.portillo@urv.cat

En cooperació amb: Universitat de Barcelona

Supervisor/es: Dra Victoria Campuzano, Dep. Biomedicina,
vcampuzanou@ub.edu

10 de Julio de 2020



Jo, “María Marco Aisa”, amb DNI “73222902-X”, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprova el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona, 10 de julio de 2020

ADAPTACIÓN DEL TRABAJO DE FIN DE GRADO AL CONFINAMIENTO POR LA COVID-19

Debido al estado de alarma tuvimos que dejar de ir al laboratorio de manera prematura. Muchos de los experimentos se quedaron a medias o no pudieron llegar a realizarse y, además, de todos ellos no pudimos realizar el número de animales necesarios para que los resultados sean concluyentes.

Antes de que tuviéramos que dejar de ir al laboratorio, pudimos obtener algunos resultados, que son los que están expuestos en este trabajo; sin embargo, me gustaría recalcar que todos ellos son preliminares.



Índice

1. Datos del centro	1
2. Resumen	2
3. Introducción	3
3.1. Base genética del síndrome de Williams-Beuren	3
3.2. Manifestaciones clínicas	4
3.3. Modelo de ratón de delección completa	6
3.4. Posibles tratamientos terapéuticos	7
<i>Antecedentes</i>	<i>8</i>
3.5. La microglía activada como posible marcador de las alteraciones neuroconductuales WBS	9
4. Hipótesis	13
5. Objetivos específicos	14
6. Materiales y métodos	14
6.1. Mantenimiento de los animales	14
6.2. Administración del tratamiento	14
6.3. Preparación histológica	15
6.4. Inmunohistoquímica	15
6.5. Imagen	17
6.6. Cuantificación de las células microgliales	17
6.7. Análisis estadístico	18
6.8. Diseño de primers	18
7. Resultados	19
7.1. El vehículo (DMSO) no tiene efectos en el número de células microgliales del modelo murino CD y del modelo WT	19
7.2. El DMSO no afecta al número de células microgliales proinflamatorias	20
7.3. No existen diferencias significativas en la cantidad de células microgliales entre machos basales y tratados con VER y CUR	22

7.4. Existen diferencias significativas en el número de células microgliales proinflamatorias entre los machos CD basales y los tratados con VER y CUR.....	24
7.5. No existen diferencias significativas en la cantidad de microglía entre machos y hembras tras el tratamiento combinado de VER y CUR	25
7.6. No existen diferencias significativas en el número de células microgliales proinflamatorias entre machos y hembras tras el tratamiento combinado de VER y CUR	27
 8. Discusión.....	 28
 9. Conclusiones	 32
 10. Bibliografía.....	 33
 11. Valoración personal.....	 39
 12. Anexos.....	 40

1. Datos del centro

Este Trabajo de Fin de Grado (TFG) se basa en las prácticas extracurriculares que he realizado en el grupo de investigación 'Enfermedades genéticas del tejido conjuntivo: el síndrome de Williams' de la Universidad de Barcelona (UB) desde finales de enero hasta principios de marzo de 2020. El trabajo ha sido tutorizado por la Dra. Victoria Campuzano Uceda y la tutora académica Carmen Portillo.

El grupo de investigación pertenece al departamento de Biomedicina de la Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud de la UB. Dicho grupo está liderado por la directora de este TFG, Victoria Campuzano Uceda.

La línea de investigación principal del grupo es el síndrome de Williams-Beuren, una enfermedad del tejido conjuntivo cuyo síntoma principal es una discapacidad leve o moderada. Dentro de esta línea de investigación, el grupo se centra, entre otros aspectos, en la identificación de biomarcadores moleculares, el análisis de posibles comportamientos depresivos en modelos de ratón, así como intervenciones farmacológicas.

Este TFG se ha centrado en la línea de investigación referente a la identificación de biomarcadores moleculares. En concreto, se ha estudiado la microglía como posible biomarcador molecular en las alteraciones neuroconductuales del síndrome de Williams-Beuren.

2. Resumen

El síndrome de Williams-Beuren (WBS) es un trastorno del desarrollo neurológico poco frecuente causado por una delección de 1,5 Mb en el cromosoma 7q11.23. El modelo murino de delección completa (CD) de la enfermedad incluye la delección más común encontrada en pacientes con WBS, así como su fenotipo neurocognitivo. Recientemente se ha observado en ciertas enfermedades neurodegenerativas que las alteraciones neuroconductuales se ven determinadas por un entorno de neuroinflamación crónica, ya que ésta facilita el daño y la muerte neuronal. Las células proinflamatorias son las encargadas de desencadenar los procesos de neuroinflamación. Estudios anteriores han confirmado que un tratamiento combinado de verapamilo, un medicamento ampliamente utilizado en la población general, y curcumina, un fenol natural encontrado en la cúrcuma, mejora los rasgos conductuales WBS. Hemos realizado un estudio para investigar los efectos de este tratamiento combinado en la inflamación de las células microgliales, con el fin de determinar si las alteraciones conductuales WBS presentan un componente microglial. Se realizaron una serie de análisis histológicos para evaluar la cantidad de células microgliales y el porcentaje de células proinflamatorias. El tratamiento fue capaz de disminuir significativamente el número de células proinflamatorias presentes en los animales CD; sin embargo, no produjo variaciones en el número total de células microgliales. Los resultados son preliminares, pero es posible que el tratamiento presente una actividad antiinflamatoria, la cual ha sido observada en los componentes por separado tras estudiarlos como tratamiento de ciertas enfermedades neurodegenerativas. En consecuencia, estos resultados sugieren que los efectos beneficiosos del tratamiento combinado de verapamilo y curcumina en las alteraciones neuroconductuales WBS, podrían ser fruto de una reducción de la inflamación microglial.

Palabras clave: *Síndrome de Williams-Beuren, rasgos conductuales, microglía, activación crónica, neuroinflamación, enfermedades neurodegenerativas, tratamiento, curcumina, verapamilo.*



3. Introducción

El síndrome de Williams-Beuren (WBS, OMIM 194050) es un trastorno del desarrollo neurológico poco frecuente, con una prevalencia estimada de 1 en 7,500 a 1 en 20,000 recién nacidos (Strømme *et al.*, 2002), que es causado por una delección heterocigota de 26-28 genes contiguos (1,55-1,83 Mb) presentes en el brazo largo del cromosoma 7 (7q11.23) (Peoples *et al.*, 2000).

3.1. Base genética del síndrome de Williams-Beuren

La región cromosómica reorganizada en pacientes con WBS (7q11.23) está flanqueada por tres elementos de repetición de baja copia (LCR centroméricos [c], mediales [m] y teloméricos [t]) (Valero *et al.*, 2000), que presentan un alto grado de homología y están muy próximos entre sí.

El alto grado de homología, así como la proximidad, predisponen a la región cromosómica WBS a desalinearse durante la meiosis (Urban *et al.*, 1996) y, en menor medida, a sufrir cambios genéticos como la duplicación (Van der Aa *et al.*, 2009). Si se produce un cruce meiótico desigual, la región puede eliminarse, tal y como se representa en la Figura 1, desarrollándose el WBS.

En más del 98% de las personas WBS, los puntos de rotura de la región cromosómica WBS se producen dentro de los LCR medial y centromérico y conducen a una eliminación de aproximadamente 1,5 millones de pares de bases que codifican de 26 a 28 genes; con menos frecuencia, se produce una eliminación mayor de 1,8 millones de pares de bases que codifican los 28 genes (Del Campo *et al.*, 2006). Sin embargo, un 2% de las personas WBS presentan delecciones atípicas (Morris, 2010), en las que se ve implicada la región LCR telomérica.

Esta delección meiótica puede ocurrir tanto en el cromosoma 7 heredado por vía materna como por vía paterna. En prácticamente todos los casos, se produce de manera esporádica (*de novo*) durante la formación de los gametos, por tanto, los padres sanos no llevan la delección (Sadler *et al.*, 1993). Sin embargo, se ha observado que el 33% de los progenitores son heterocigotos para una inversión paracéntrica que abarca toda la región WBS (1,5 Mb). Aunque esta inversión se considera un polimorfismo benigno (los portadores son fenotípicamente normales) (Tam *et al.*, 2008), puede incitar a un emparejamiento cromosómico desigual en

la profase meiótica durante la producción de los gametos y, por lo tanto, puede predisponer a la eliminación de la región WBS (Osborne *et al.*, 2001).

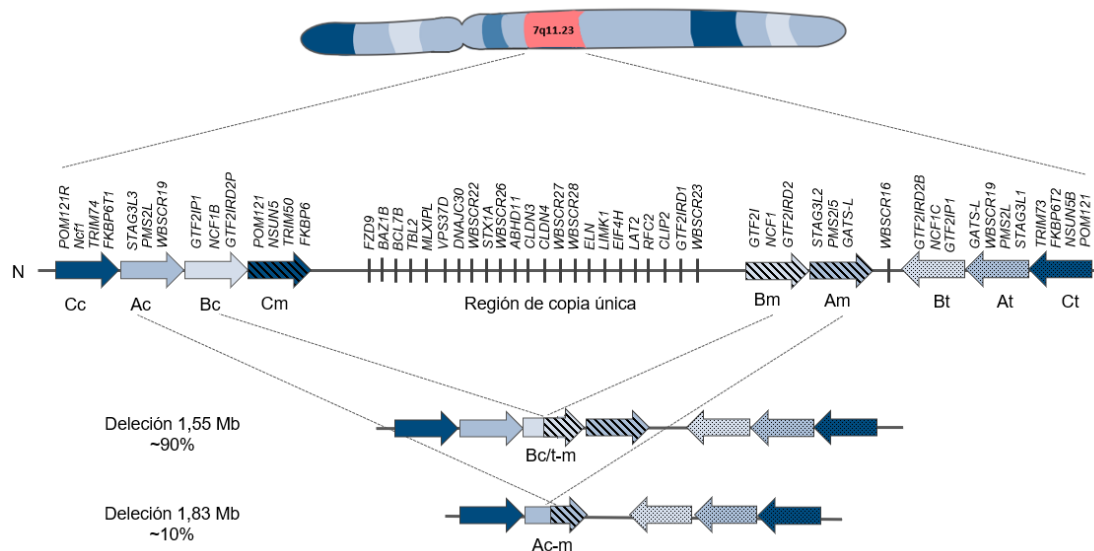


Figura 1. Representación esquemática de la región genómica 7q11.23 en cromosomas normales (N) y cromosomas con las deleciones WBS (deleción 1,55 Mb y deleción 1,83 Mb). Los límites de la región común eliminada (1,55 Mb) y de la más inusual (1,83 Mb) encontradas en los pacientes con WBS se indican con líneas de puntos. Las deleciones atípicas no se representan en esta figura. (Figura adaptada de Del Campo *et al.*, 2006; Pober, 2010 y Van der Aa *et al.*, 2009)

3.2. Manifestaciones clínicas

Las personas con WBS se han caracterizado por tener déficits intelectuales de leves a moderados, con un cociente intelectual medio (CI) 55-60. Así como, anomalías del tejido conectivo, enfermedades cardiovasculares y dismorfología facial (Pober & Dykens, 1996).

Por un lado, las características faciales son distintivas y varían según la edad. Los niños pequeños a menudo presentan un puente nasal plano, nariz corta y hacia arriba, hinchazón periorbitaria, filtrum largo y mentón delicado, mientras que los pacientes mayores tienen rasgos ligeramente toscos con labios carnosos y una amplia sonrisa (Morris & Mervis, 2000) (Figura 2A). Por otro lado, en cuanto a las afecciones WBS cardiovasculares, la anomalía más común es la estenosis aórtica



supravalvular (Figura 2B), que afecta al 70% de los pacientes con WBS (Poher *et al.*, 2008) y es provocada por la pérdida de la expresión de un alelo de elastina (ELN) tras la delección de la región cromosómica WBS. Esta estenosis puede aislarse o puede ocurrir simultáneamente en otras regiones cardiovasculares y, a menudo, conduce a hipertensión arterial (Hallidie-Smith *et al.*, 1988). Los pacientes WBS también presentan irregularidades endocrinas como hipercalcemia, diabetes mellitus, hipotiroidismo subclínico o una velocidad de crecimiento disminuido. Sin embargo, son las anomalías del neurodesarrollo las de mayor interés en nuestro estudio.

El perfil cognitivo de las personas con WBS está fraccionado, presentan un lenguaje relativamente intacto, pero presentan severas deficiencias en las habilidades visuoespaciales y de procesamiento facial. Estos déficits visuoespaciales se manifiestan principalmente por una representación espacial alterada, ya que estos pacientes perciben correctamente la orientación espacial de un elemento, pero no su relación con el resto de los objetos (Jordan *et al.*, 2002). Por el contrario, como se ha comentado, el lenguaje a menudo se ha considerado preservado, incluso "intacto". Sin embargo, se ha observado que los pacientes WBS tienen trastornos en dos situaciones de comunicación, la conversación y la narración. En cuanto a su personalidad, ha sido descrita como hipersociable y empática (Bellugi *et al.*, 1999b). Son niños que se acercan muy fácilmente a personas que no conocen, ya que se sienten muy atraídos por las caras (Jones *et al.*, 2000). Sin embargo, a pesar de la personalidad amigable, muchos están socialmente aislados, ya que la mayoría tienen preocupaciones y miedos excesivos. Así mismo, se ha afirmado que sus habilidades musicales superan su nivel cognitivo y que sus intereses musicales, creatividad musical y reacciones emocionales hacia la música exceden a las de los pacientes sin WBS (Levitin *et al.*, 2003).

Durante años se han intentado dilucidar los aspectos cerebrales involucrados en este perfil cognitivo asociado con WBS. Los exámenes neurológicos y las imágenes cerebrales en pacientes con WBS han mostrado cambios en la anatomía y función del cerebro, incluidas reducciones del 10 al 15% en el volumen cerebral total (Figura 2C).

En cuanto a las alteraciones en la anatomía, se han observado anomalías de los patrones de plegamiento de la superficie cortical, así como alteraciones

estructurales en diferentes regiones del cerebro, como la amígdala, el tronco encefálico, el cerebelo, el cuerpo caloso, el hipocampo y el tálamo (Chiang *et al.*, 2007). En concreto, se ha observado que una reducción desproporcionada del cuerpo caloso y del tálamo conduce a los déficits visoespaciales WBS. Por otro lado, también se han observado alteraciones funcionales del cerebro que afectan a la corteza orbitofrontal y al sistema visual, así como al hipocampo (Jackowski *et al.*, 2009).

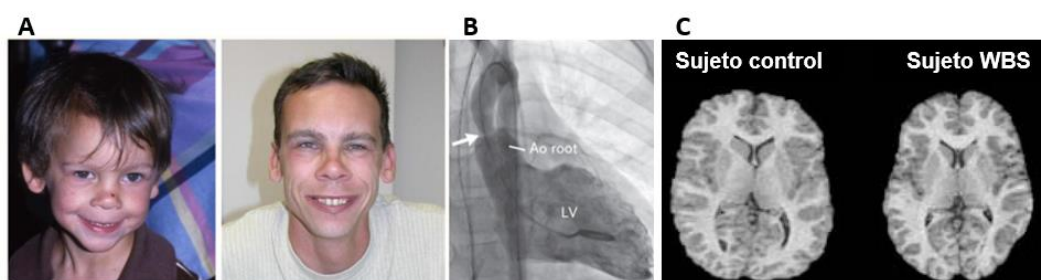


Figura 2. Manifestaciones clínicas del WBS. (A) Cambio del fenotipo facial de un paciente WBS: izquierda, 3,5 años; derecha, 21 años (Figura tomada de Morris, 2010). (B) Angiografía del ventrículo izquierdo en un niño de 5 años con WBS. Muestra estenosis aórtica supravalvular severa (flecha) (Figura tomada de Burch *et al.*, 2008). (C) Resonancia magnética del cerebro de un paciente control y un paciente WBS. Se puede observar una disminución del volumen cerebral en el sujeto WBS respecto al control (Figura tomada de Chiang *et al.*, 2007).

3.3. Modelo de ratón de delección completa

El modelo de ratón de delección completa (CD) es un modelo que presenta la delección WBS más común en pacientes. Estos animales recapitulan la mayoría de los fenotipos propios del trastorno en humanos, incluidas múltiples anomalías tanto estructurales como funcionales presentes en diferentes áreas del cerebro de pacientes WBS. Entre los fenotipos WBS recapitulados encontramos un peso cerebral reducido, alteraciones en el comportamiento (Reinecke *et al.*, 2013), deficiencias en la coordinación motora, un comportamiento similar a la ansiedad e hipersociabilidad (Segura-Puimedon *et al.*, 2014).

Se ha observado que las alteraciones en el fenotipo neurocognitivo del modelo murino CD se deben a una desregulación de procesos cerebrales como la diferenciación neuronal, la maduración y la función sináptica. Esta desregulación



es causada por una expresión génica alterada en el tejido cortical del modelo CD, la cual es provocada por la pérdida de ciertos genes tras la delección de la región cromosómica WBS (Numakana *et al.*, 2018).

Debido a la similitud con los pacientes humanos, este modelo es útil para profundizar en los mecanismos fisiopatológicos de la enfermedad, y es el modelo utilizado para evaluar diferentes enfoques terapéuticos (Borralleras *et al.*, 2015; Ortiz-Romero *et al.*, 2018).

3.4. Posibles tratamientos terapéuticos

Dada la complejidad del perfil cognitivo de los pacientes con WBS, a menudo requieren la asistencia de un profesional de la salud mental. Sin embargo, la intervención farmacológica suele ser inexacta y solo está dirigida a tratar la ansiedad.

La ansiedad de los pacientes WBS es tratada mediante medicamentos antidepresivos, ansiolíticos y antipsicóticos, que, a menudo, se utilizan para tratar la ansiedad o la depresión en la población general. Sin embargo, no se han realizado estudios consistentes de su efectividad en pacientes WBS.

Martens *et al.*, 2012 examinaron informes de padres de pacientes WBS que trataban sobre la efectividad y los efectos secundarios de estos medicamentos. Aunque la mayoría de los padres indicaron que la medicación fue 'útil' o 'algo útil' en el tratamiento de los síntomas de ansiedad, también afirmaron la presencia de efectos secundarios gastrointestinales, conductuales, metabólicos, neurológicos y psicológicos tras la toma.

Por esta razón, es interesante estudiar cualquier tratamiento potencial que pueda mejorar los deterioros cognitivos observados en WBS, teniendo en cuenta cómo los efectos secundarios del tratamiento pueden afectar a la sintomatología base del paciente WBS.

En los últimos años, el estudio de los efectos terapéuticos de los polifenoles naturales ha ganado atención debido a sus propiedades beneficiosas a nivel cognitivo y cardiovascular. Diferentes estudios han propuesto tratamientos basados en fenoles naturales como terapia para el WBS. Estos tratamientos se basan, por un lado, en la administración de epigallocatequina-3-galato (EGCG), la catequina más abundante en el té verde (Ortiz-Romero *et al.*, 2018); y, por otro

lado, en el consumo combinado de curcumina (CUR), el fenol más abundante en la cúrcuma, y verapamilo (VER), un medicamento ampliamente utilizado para el tratamiento de trastornos cardíacos (datos no publicados).

El consumo de té verde se ha asociado con posibles efectos terapéuticos sobre enfermedades cardiovasculares, inflamatorias y neurológicas, entre otras (Scheneider *et al.*, 2009). En cuanto a los efectos terapéuticos a nivel cognitivo, los polifenoles del té verde en el caso del modelo murino CD fueron capaces de rescatar ciertas características del fenotipo neurocognitivo WBS, como la memoria a corto plazo y los niveles normalizados de *Bdnf* en el hipocampo. El *Bdnf* es una molécula de señalización clave para la plasticidad sináptica y la memoria espacial. Aunque el tratamiento mejora la memoria a corto plazo, no se observaron mejoras en la memoria de trabajo espacial, la ansiedad o la sociabilidad, ni efectos en la remodelación neuroanatómica (Ortiz-Romero *et al.*, 2018). De manera que, el tratamiento es capaz de mejorar ciertos rasgos cognitivos WBS, pero no el perfil cognitivo en su totalidad.

Antecedentes

Por otro lado, como se ha comentado, también se ha estudiado un tratamiento combinado de VER y CUR en el modelo murino CD de WBS (datos no publicados).

Estudios recientes han descrito efectos farmacológicos de la CUR en diferentes aspectos cognitivos como comportamientos de ansiedad, déficits de memoria y discapacidades motoras, debido a sus propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y neuroprotectoras (Hay *et al.*, 2019). Así mismo, el VER, aunque se ha estudiado principalmente para aplicaciones cardiovasculares, también se ha asociado con efectos positivos sobre la ansiedad y el procesamiento de la memoria (Biala *et al.*, 2008; Quartermain *et al.*, 2001).

El tratamiento provocó una mejora significativa en la descoordinación motora. Los efectos se deben a la complementariedad de ambos componentes, ya que de manera individual ninguno de ellos tuvo un efecto positivo. Así mismo, como se ha comentado anteriormente, la hipersociabilidad y la ansiedad son características remarcables del perfil cognitivo de los pacientes WBS (Bellugi *et al.*, 1999b). En este estudio se observó que, tras el tratamiento de los ratones CD con CUR, éstos tenían una pérdida de interés en ratones intrusos, lo cual demuestra un efecto positivo de esta molécula en el comportamiento social de los animales CD.



Sin embargo, aunque se les atribuyen a ambas moléculas efectos ansiolíticos (Gopala Krishna *et al.*, 2001; Gilhotra *et al.*, 2010), ninguno de los tratamientos individuales causó cambios a nivel de ansiedad en los animales CD.

Por otro lado, como se ha comentado, la pérdida de los genes de la región cromosómica WBS provoca una expresión génica diferencial que puede afectar a vías de señalización involucradas en la regulación de una variedad de procesos que incluyen la diferenciación neuronal, la maduración y la función sináptica (Numakana *et al.*, 2018). El tratamiento combinado de VER y CUR provocó una recuperación de dichas vías de señalización. Esta mejora puede contribuir a la recuperación de la funcionalidad de la señalización sináptica, la cual puede estar correlacionada con las mejoras observadas en el comportamiento.

También se encontraron alteradas en el tejido cortical otras rutas alternativas relacionadas con la modulación del comportamiento y la conformación de la matriz extracelular. La conservación de las estructuras de la matriz extracelular en el sistema nervioso central es fundamental para procesos como la migración celular, el crecimiento neuronal, la sinaptogénesis y la plasticidad sináptica, entre otros (Song *et al.*, 2018). Sin embargo, en este caso, el tratamiento no pudo recuperar completamente los déficits encontrados en estas vías y en la conformación de la matriz extracelular, lo que puede correlacionarse con la falta de mejora en las características neuroanatómicas observadas al evaluar la morfología cerebral.

3.5. La microglía activada como posible marcador de las alteraciones neuroconductuales WBS

Las microglías son las células inmunes primarias del sistema nervioso central y forman parte de un grupo de células conocidas como células gliales. Se trata de células altamente plásticas (Eggen BJ *et al.*, 2013).

En condiciones de reposo (M0), la microglía lleva a cabo funciones relacionadas con el mantenimiento de la homeostasis y presenta una morfología ramificada, caracterizada por cuerpos celulares pequeños y numerosas ramificaciones largas, que le permiten estar en contacto con otras células como neuronas o astrocitos (Ransohoff *et al.*, 2009). La microglía ramificada expresa en su membrana receptores encargados de escanear continuamente el medio ambiente en busca de señales de peligro asociadas con patógenos o lesiones (Nimmerjahn *et al.* 2005). Ante un estímulo patógeno o de daño, las microglías experimentan un

cambio en la morfología y la función y cambian a un estado activado o amebosoide. La activación microglial se describe como un proceso gradual, en el que las ramificaciones se retraen y se engruesan y aumenta el tamaño del cuerpo celular (Eggen BJ *et al.*, 2013), las células proliferan y migran y comienzan a secretar citocinas y especies radicales, con el fin de desencadenar una respuesta inmunitaria (Hickman *et al.*, 2018).

Se ha observado que, dependiendo de la señal detectada y del entorno local, la microglía puede sufrir diversos cambios en la morfología y la función.

Por un lado, puede activarse hacia un perfil de tipo proinflamatorio (activación clásica o M1), gracias a la presencia de receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) en su membrana. Estos receptores promueven una respuesta inmune innata proinflamatoria, que provoca un aumento de la producción y expresión de diversas citocinas (interleucina 1-beta [IL-1 β], interleucina 6 [IL-6], interleucina 12 [IL-12], interferón beta1 [IFN- β 1] o factor de necrosis tumoral alfa [TNF- α]) y también pueden realizar una respuesta neurotóxica mediante especies reactivas de oxígeno o de nitrógeno (ROS y RNS, respectivamente). Así mismo, la microglía puede polarizarse hacia un fenotipo M1 tras la exposición a lipopolisacáridos (LPS) y a citocinas proinflamatorias como interferón gamma (IFN- γ) o TNF- α (Ransohoff *et al.*, 2009). Por otro lado, la microglía puede activarse hacia un perfil antiinflamatorio o M2. En este caso, se encarga de promover la cicatrización, la regeneración del tejido y la angiogénesis (Sica & Mantovani, 2012). En este tipo de activación, la microglía se caracteriza por la secreción de diversas citocinas y quimiocinas, que permiten subdividir a la microglía en diferentes subtipos M2. El estado M2a o de activación alterna, inducido por la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 13 (IL-13); el estado M2b o de cicatrización, inducido por la activación de los receptores Fc gamma (Fc γ) y de tipo Toll (TLR); y el estado M2c o de reparación y remodelado del tejido dañado, observado en respuesta a factores antiinflamatorios como la interleucina 10 (IL-10), el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y glucocorticoides. Aunque los tres subtipos cumplen con funciones antiinflamatorias, se puede remarcar, por ejemplo, el perfil M2b que se caracteriza por secretar citocinas tanto pro- (IL-1 β , IL-6 o TNF- α) como antiinflamatorias (IL-4, IL-10 y TGF- β) lo que resalta el papel inmunomodulador de este perfil (Orihuela *et al.*, 2016).

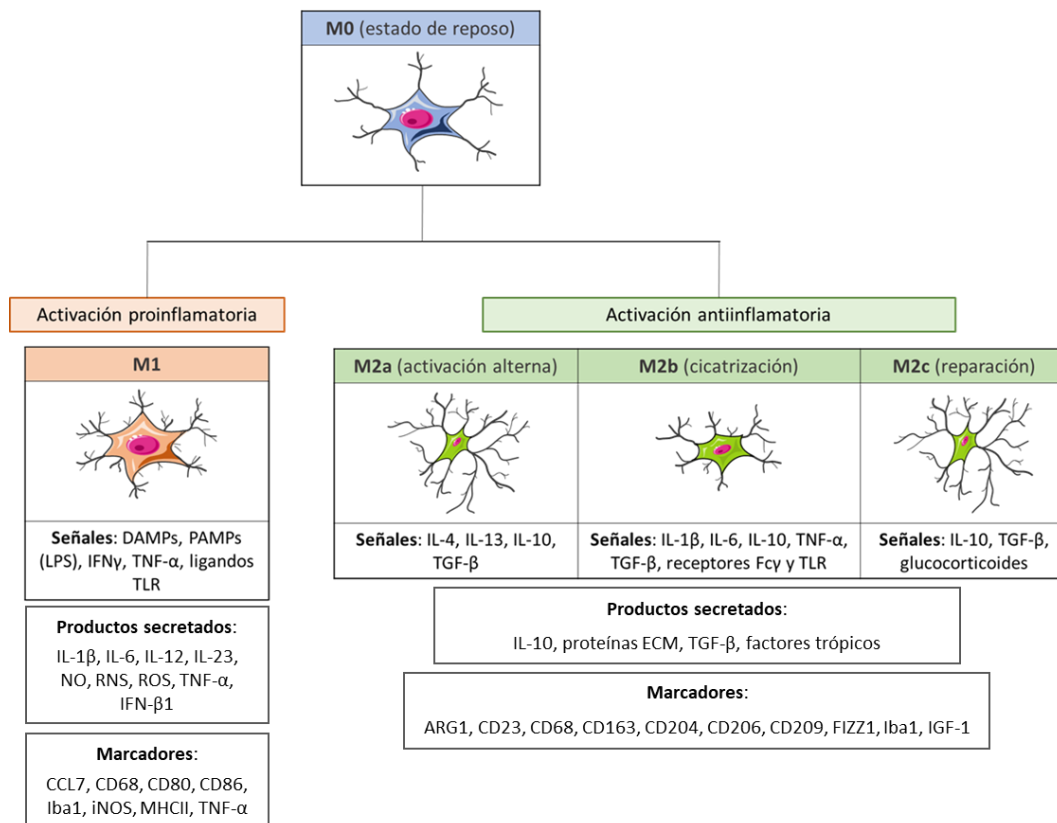


Figura 3. Perfiles de activación de la microglía. En estado de reposo (M0), la microglía expresa en su membrana receptores encargados de escanear el entorno. En función del estímulo detectado, la microglía puede adquirir diferentes perfiles de activación. El perfil M1 o proinflamatorio y el perfil M2, que se subdivide en: M2a o de activación alterna, M2b o de cicatrización y M2c o de reparación. Podemos observar en la imagen las señales necesarias para que la célula polarice hacia ese perfil de activación, así como los productos secretados y los posibles marcadores celulares.

En condiciones fisiológicas normales, la respuesta inflamatoria aguda es un proceso de corto termino efectivo en la eliminación de agentes potencialmente perjudiciales para el sistema nervioso central. Una vez que el factor desencadenante ya ha sido eliminado, el proceso es seguido por una resolución de la inflamación, reparación tisular, descongestión de las células fagocitarias y homeóstasis; todo mediado por citocinas antiinflamatorias y mediadores lipídicos antiinflamatorios como lipoxinas, resolvinas y neuroprotectinas. Por tanto, el papel de la microglía es esencial para el desarrollo y progresión de la neuroinflamación: la desencadena mediante la producción de factores citotóxicos y la revierte con los factores antiinflamatorios (DiSabato *et al.*, 2016).

Si existe una exposición prolongada a estímulos ambientales o a estímulos endógenos asociados a ciertas enfermedades neurodegenerativas, se desregula el balance entre los dos fenotipos conduciendo a la polarización del fenotipo neurotóxico. En estas condiciones, las microglías se activan y expresan constitutivamente ROS, RNS y citocinas proinflamatorias (Von Bernhardi, *et al.*, 2015).

Las reacciones oxidativas son parte del metabolismo celular, por lo que las células poseen mecanismos para contrarrestar la formación de especies reactivas. En condiciones fisiológicas, estos procesos están altamente regulados por el sistema antioxidante para evitar daños. Sin embargo, cuando se produce una desregulación de la señalización redox y la formación de especies reactivas supera las enzimas antioxidantes, se genera estrés oxidativo, que produce daño a diferentes biomoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos.

La microglía al detectar una mayor presencia de especies reactivas se activa y produce más especies reactivas, favoreciendo así un ambiente inflamatorio y oxidativo presente en las enfermedades neurodegenerativas.

La activación de diferentes vías inflamatorias, junto con la activación de la actividad oxidante generan un entorno proinflamatorio y prooxidante constitutivo y crónico que, junto con los cambios fisiológicos de la microglía asociados con el envejecimiento, facilitan el daño y la muerte neuronal.

Finalmente, una vez que el fenotipo neurotóxico se sobreactiva, el daño neuronal se extenúa y al mismo tiempo activa a la microglía desencadenando así un 'círculo vicioso' de daño neuronal y activación crónica denominado *microgliosis reactiva*, un proceso que se ha observado en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o el Párkinson (Chen *et al.*, 2016).

Es por ello por lo que, aunque la activación microglial proporciona una defensa contra lesiones e infecciones, la activación crónica o excesiva se considera perjudicial, ya que causa daño neurológico y anticipa la neurodegeneración.

No existen evidencias de que este proceso ocurra en el síndrome de Williams-Beuren, pero, tratándose de un trastorno del neurodesarrollo, se podría pensar que la microglía está involucrada en las alteraciones neuroconductuales WBS. Por esta razón, es interesante estudiar si la microglía está involucrada en la mejora de



los rasgos conductuales WBS de los animales CD tras el tratamiento combinado de VER y CUR.

Para la detección de microglía activada se utilizan diferentes métodos, entre los que se encuentra la inmunohistoquímica de la proteína adaptadora de unión a calcio ionizada (Iba1) y la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) de diferentes genes involucrados en la neuroinflamación.

La Iba1 es una proteína de unión a actina de 17 kDa, que sirve como marcador para la detección de las células microgliales activadas. Esta proteína se expresa específica y constitutivamente en dichas células, pero no en neuronas, astroglia u oligodendroglía (Ito *et al.*, 1998). Es por ello por lo que se utiliza como marcador para detectar el número de microglías activadas.

Con el mismo objetivo, se puede realizar una qPCR para evaluar la expresión de genes involucrados en la neuroinflamación, como pueden ser la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM-1) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas 1 (TIMP-1).

Por un lado, la VCAM-1 es una molécula de adhesión que juega un papel importante en la quimiotaxis generada durante la respuesta inmunitaria (Kong *et al.*, 2018). Y, por otro lado, el TIMP-1 regula la expresión de la metaloproteinasa-9 de matriz (MMP-9), un tipo de proteasa que degrada la matriz extracelular y las proteínas de membrana, lo que resulta en el reclutamiento y activación de células inmunes en el foco de inflamación (Mroczko *et al.*, 2014).

4. Hipótesis

Las alteraciones neuroconductuales presentadas por el modelo CD, pueden tener un componente microglial (objetivos 1 y 2). El tratamiento combinado de VER y CUR en los animales CD mejora algunos rasgos conductuales regulando la inflamación a través de la microglía (objetivos 3 y 4).

5. Objetivos específicos

1. Estudiar si existen diferencias en la cantidad de células de microglía entre el modelo murino *wild-type* (WT) y el modelo CD.
2. Estudiar si existen diferencias en la morfología de la microglía activada (pro o antiinflamatoria) entre el modelo murino WT y el modelo CD.
3. Analizar si el tratamiento con VER y CUR tiene algún efecto en la cantidad de microglía en el modelo CD.
4. Analizar si el tratamiento con VER y CUR tiene alguna consecuencia en la morfología de la microglía en el modelo CD.

6. Materiales y métodos

6.1. Mantenimiento de los animales

Se utilizó el modelo murino CD. Este modelo tiene una delección heterocigota que alberga los genes codificados entre *Gtf2i* y *Fkbp6* (1,3 Mb) (Segura-Puimedon *et al.*, 2014). Para determinar si los animales eran WT o CD, se extrajo ADN genómico de la cola del ratón o de un punzón de la oreja y se realizó una PCR *multiplex* utilizando los cebadores apropiados para amplificar la secuencia del gen constitutivo IMR y del gen HPRT, específico de los animales CD (las secuencias se pueden observar en Anexos). Los animales se alojaron en condiciones estándar en un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas con acceso *ad libitum* a alimentos y agua/tratamiento. Utilizamos 2 grupos de tratamiento (vehículo y VER + CUR) por genotipo (WT y CD) de ratones machos y hembras, con n = 2-5 en todos los grupos.

6.2. Administración del tratamiento

Por un lado, para calcular el VER necesario para el tratamiento se tuvo en cuenta que la dosis más alta de VER utilizada en pacientes humanos es de 480 mg/día. De este modo, considerando un peso promedio de 25 g/ratón, se estableció una



dosis equivalente de 10 mg/kg/día. El VER se disolvió en agua potable y se mantuvo a -21 °C hasta su uso.

Por otro lado, la dosis de CUR administrada fueron 60 mg/kg/día, tal y como realizaron Babu *et al.*, 2015. Se preparó una vez por semana disolviendo un extracto de CUR (Super Bio-Curcumin, from Life Extension, USA, total curcuminoids complex with essential oils of turmeric rhizome by HPLC 400 mg) en agua potable con DMSO al 1%.

Los grupos control consistieron en: 1) ratones machos basales WT y CD y 2) ratones machos vehículo WT y CD, siendo el vehículo agua potable con 1% de DMSO. Los grupos experimentales consistieron en: 1) ratones hembras WT y CD que bebieron VER+CUR y 2) ratones machos WT y CD que bebieron VER+CUR. El tratamiento se inició a las 8 semanas de edad (ratones jóvenes). Todos los animales bebieron sus tratamientos durante 1 mes hasta el sacrificio (adultos jóvenes, 12-16 semanas de edad).

6.3. Preparación histológica

Después de la perfusión cardíaca con solución salina tamponada con fosfato 1X (PBS) seguido de paraformaldehído al 4% (PFA), se extrajo el cerebro de cada ratón. Los cerebros se eliminaron y se fijaron en PFA al 4% durante 24 horas a 4°C, en PBS durante 24 horas a 4°C y en sucrosa al 30% durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, se realizaron cortes coronales de 30 micras de cada cerebro, los cuales fueron criopreservados en *floating* en solución de sucrosa al 30%. Por último, se recogieron tres secciones coronales de 30 micras del cerebro de cada ratón en un portaobjetos de vidrio y se montaron directamente con Mowiol.

6.4. Inmunohistoquímica

Para la detección de las células de la microglía (objetivos 1 y 3) se utilizó como marcador la proteína Iba1, que, como se ha comentado, se expresa específica y constitutivamente en todas las microglías, y es regulada positivamente ante la activación de dichas células (Ito *et al.*, 1998). Los cortes escogidos se sometieron a las reacciones inmunohistoquímicas, en agitación constante, a temperatura ambiente (20°C). En primer lugar, se lavaron los cortes con PBS (3x5 minutos) y, posteriormente, con

PBS Tritón 0.3% (3x5 minutos). Tras los lavados, las secciones se incubaron con NH_4Cl 50 mM por 30 min (2x15 minutos) para romper los enlaces aldehído. A continuación, se sumergieron los cortes en PBS Tritón 0.3% (3x10 minutos), para incrementar la permeabilidad del tejido a los anticuerpos. Luego se incubaron, durante dos horas, en solución de bloqueo (2% BSA y 3% FBS en PBS) para bloquear sitios inespecíficos. Tras las dos horas, se retiró el exceso de suero y los cortes sin lavar se incubaron *over-night* con el anticuerpo primario anti-Iba1 de conejo diluido en solución de bloqueo (1:1000). Posteriormente, los cortes se lavaron con solución de bloqueo durante 30 minutos (3x10 minutos) y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario A555 anti-conejo diluido en solución de bloqueo (1:1500). Por último, tras 3 lavados con PBS (3x30 minutos), se incubaron durante 15 minutos con DAPI diluido en solución de bloqueo (1:10000). El DAPI es un tinte que marca el ADN celular y, por tanto, todas las células presentes en el corte; de manera que, nos ayudará a corroborar que la tinción roja, corresponde a la proteína Iba-1 de una célula y no a restos de tinte.

Por otro lado, para estudiar si la microglía activada tiene un perfil pro- o anti-inflamatorio (objetivos 2 y 4), se va a evaluar la expresión de marcadores propios de cada uno de los perfiles de activación. Como se ha comentado, dependiendo de la señal detectada y del entorno local, la microglía puede activarse hacia un perfil de tipo proinflamatorio (activación clásica o M1), que provoca un aumento de la expresión de diversas citocinas, como IL-1 β (Ransohoff *et al.*, 2009) o hacia un perfil antiinflamatorio o M2, que induce la expresión de citocinas como TGF- β . Es por esta razón, que evaluamos la presencia de IL-1 β y TGF- β (Sica & Mantovani, 2012).

Los cortes escogidos se sometieron al mismo proceso inmunohistoquímico, pero, además de incubarse con los anticuerpos primarios anti-Iba1 de conejo, se incubaron con los anticuerpos primarios anti-TGF β de cabra y anti-IL1 β de ratón, ambos diluidos en solución de bloqueo. Este proceso inmunohistoquímico había que ponerlo a punto, por lo que se probaron dos escenarios diferentes. Por un lado, los cortes se incubaron con una dilución de anticuerpos primarios 1:1000 anti-Iba1, 1:50 anti-TGF β y 1:500 anti-IL1 β y la posterior dilución 1:500 de los correspondientes anticuerpos secundarios (A647 anti-cabra, A405 anti-ratón, A555 anti-conejo). Y, por otro lado, se probó la incubación de los cortes con una dilución de anticuerpos primarios 1:1000 anti-Iba1, 1:100 anti-TGF β y 1:1000 anti-



IL1 β y la posterior dilución 1:1500 de anticuerpos secundarios (A647 anti-cabra, A405 anti-ratón, A555 anti-conejo).

6.5. Imagen

Para analizar la densidad y el perfil de activación microglial, se obtuvieron imágenes fluorescentes confocales de 1024x1024 píxeles de secciones de tejido coronal de 30 micras con un microscopio confocal espectral de alta velocidad y multifotón LEICA TCS-SP5. Las imágenes se obtuvieron de zonas del hipocampo CA1, de la corteza motora y de la corteza somatosensorial. Se analizaron 2-5 animales por grupo, y se analizaron las zonas detalladas (Figura 4) en 3 cortes diferentes por animal.

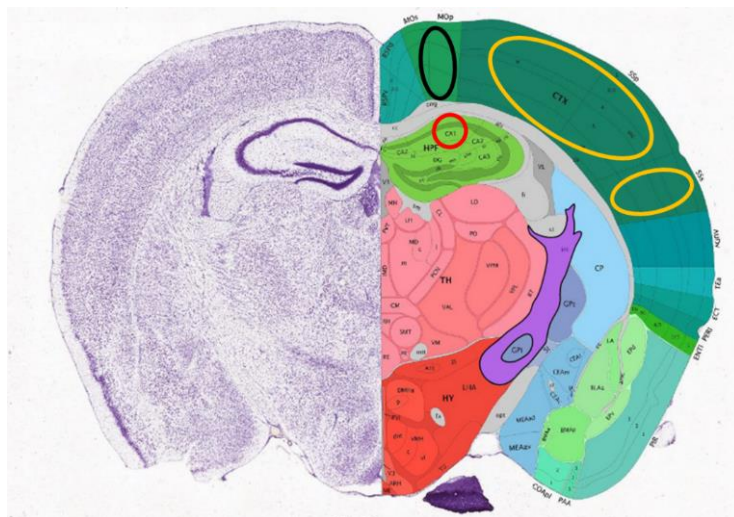


Figura 4. Zonas fotografiadas. Se fotografiaron y se analizaron las 4 zonas detalladas: el hipocampo CA1 (círculo rojo), la corteza motora (círculo negro) y la corteza somatosensorial primaria y secundaria (círculos amarillos), todas ellas en los dos hemisferios. Figura adaptada de Brain Atlas (Institute Allen)

6.6. Cuantificación de las células microgliales

Se utilizó el software Image J para la cuantificación.

Tras la cuantificación de las células microgliales activadas, se determinó el porcentaje de células con un perfil de activación proinflamatorio y antiinflamatorio.

Para ello, se evaluó de manera subjetiva la morfología de cada una de las microglías activadas. Aquellas que presentaban un cuerpo celular grueso y ramificaciones cortas se cuantificaron como proinflamatorias y aquellas con un número elevado de ramificaciones largas se agruparon como antiinflamatorias (tal y como se representa en la Figura 3). Las cuantificaciones totales de células microgliales proinflamatorias y antiinflamatorias se relativizaron teniendo en cuenta el número total de microglías cuantificadas.

Las cuantificaciones de células microgliales proinflamatorias presentadas en este trabajo se obtuvieron a través de este método, ya que no dio tiempo de poner a punto la inmunohistoquímica de TGF β e IL1 β , explicada anteriormente.

6.7. Análisis estadístico

Se utilizó el software Graphpad Prism 8 para obtener todas las pruebas estadísticas y gráficas.

Las cuantificaciones de las imágenes fotografiadas se agruparon por regiones (corteza motora, corteza somatosensorial e hipocampo), teniendo en cuenta que de cada región había dos imágenes, una de cada hemisferio. Así mismo, las cuantificaciones de las imágenes de la corteza somatosensorial primaria y secundaria se agruparon como corteza somatosensorial.

Se realizaron ANOVAS de dos vías y Tukey post-hoc. Los valores se consideraron significativos cuando $p < 0.05$ y se representaron gráficamente mediante un asterisco.

6.8. Diseño de primers

Como se ha explicado en la Introducción, se pretende realizar una qPCR con los genes VCAM-1 y TIMP1, presentes en los procesos de neuroinflamación. Para ello, hay que diseñar un conjunto de *primers* para cada gen.

Para el diseño de los *primers* se utilizaron tres softwares diferentes: *Ensembl*, *Primer3* y *UCSC In-Silico PCR*.

Ensembl nos permitió obtener la secuencia nucleotídica de los diferentes genes y elegir los exones a los cuales íbamos a dirigir los *primers*. *Primer3* nos diseñó la secuencia de cada uno de los *primers*, teniendo en cuenta los exones elegidos.



UCSC *In-Sílico* PCR simula el proceso de PCR que se llevaría a cabo con los primers que nos ha generado *Primer3*, lo que nos ayudó a observar el amplicón que se obtendría.

GEN	SECUENCIA PRIMERS	T _M (°C)	TAMAÑO (bp)
VCAM-1	F ATTTTCTGGGGCAGGAAGTT	59.9	238
	R ACGTCAGAACAACCGAATCC	60.0	
TIMP1	F GCATCTGGCATCCTCTTGTT	60.2	374
	R CTCAGAGTACGCCAGGGAAC	59.9	

Tabla 1. Secuencia del primer forward (F) y reverse (R) diseñados para los genes VCAM-1 e TIMP1. Los primers F y R del gen VCAM-1 tienen una temperatura de melting de 59.9°C y 60.0°C, respectivamente, y dan lugar a un amplicón de 238 bp. Así mismo, los primers F y R del gen TIMP1 tienen una temperatura de melting de 60.2°C y 59.9°C, respectivamente, y dan lugar a un amplicón de 374 bp.

7. Resultados

7.1. El vehículo (DMSO) no tiene efectos en el número de células microgliales del modelo murino CD y del modelo WT

Dentro de los grupos control evaluados en el estudio, encontramos el grupo de ratones machos WT y CD vehículo que bebieron agua potable tratada con DMSO al 1%. La CUR adicionada en el tratamiento se disolvió previamente con DMSO al 1%, de manera que era necesario evaluar si el DMSO al 1% tenía efectos en el número de células microgliales.

La cantidad de microglía se determinó mediante la tinción inmunohistoquímica de la proteína Iba1 y su posterior cuantificación (Figura 5). Como se ha explicado en Materiales y Métodos, las cuantificaciones se agruparon en las siguientes regiones: corteza motora (CM), corteza somatosensorial (CS) e hipocampo (HP), de cada una de las cuales se ha hecho el análisis estadístico y la posterior representación.

Tras realizar una ANOVA de dos vías, los resultados muestran que no existen diferencias significativas ni a nivel de tratamiento ($F_{CM(1,3)}=1,998$; $p=0,2524$ /

$F_{CS}(1,3)=4,771$; $p=0,1169$ / $F_{HP}(1,3)=2,394$; $p=0,2196$) ni a nivel de genotipo ($F_{CM}(1,3)=3,328$; $p=0,1653$ / $F_{CS}(1,3)=3,579$; $p=0,1549$ / $F_{HP}(1,3)=3,051$; $p=0,1790$) en el número de células microgliales entre los grupos tratados con DMSO al 1% y los grupos basales.

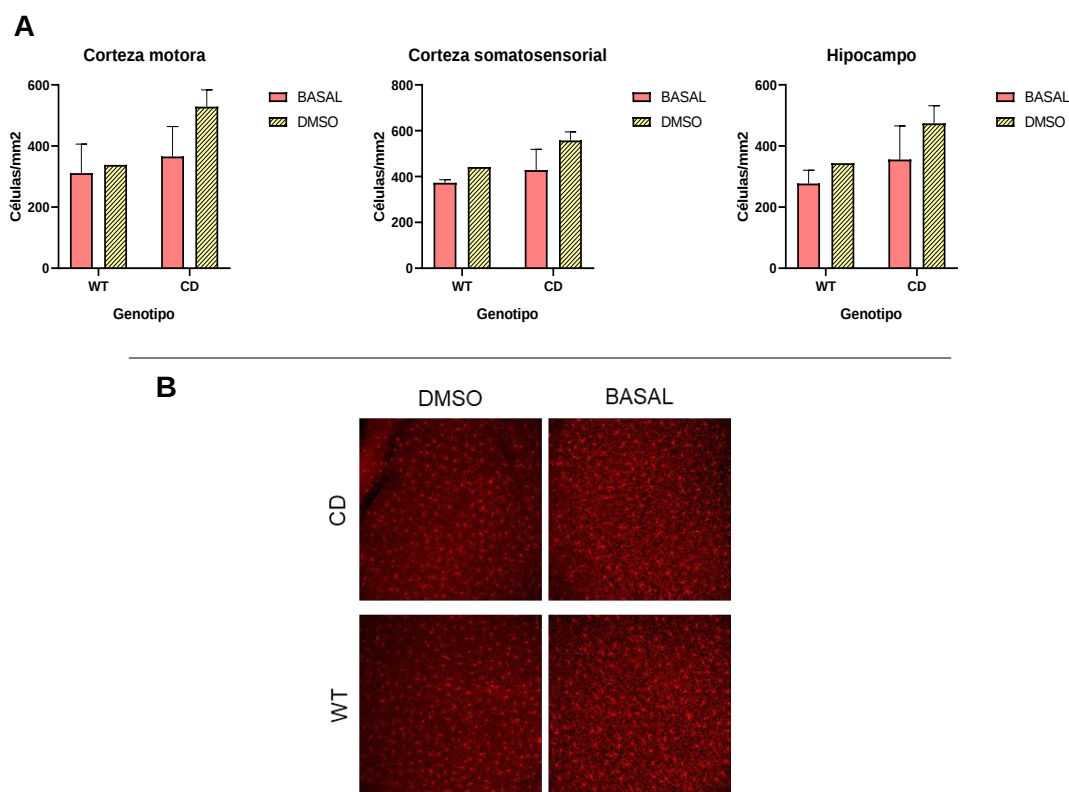


Figura 5. El vehículo (DMSO) no tiene efectos en el número de células microgliales del modelo murino CD y del modelo WT. (A) Representación gráfica de las células microgliales por mm^2 de la corteza motora (CM), la corteza somatosensorial (CS) y el hipocampo (HP) del modelo murino CD y del modelo WT, ambos machos. No se obtuvieron diferencias significativas ni a nivel de tratamiento ($F_{CM}(1,3)=1,033$; $p=0,3844$ / $F_{CS}(1,3)=0,4464$; $p=0,5518$ / $F_{HP}(1,3)=0,1884$; $p=0,6936$) ni a nivel de genotipo ($F_{CM}(1,3)=3,328$; $p=0,1653$ / $F_{CS}(1,3)=3,579$; $p=0,1549$ / $F_{HP}(1,3)=3,051$; $p=0,1790$) en las regiones evaluadas. **(B)** Imagen confocal de la región de la corteza motora tras una tinción inmunohistoquímica de la proteína Iba1, presente en las células microgliales. Imágenes tomadas en el modelo murino CD y en el modelo WT basales y tras el tratamiento con DMSO.

7.2. El DMSO no afecta al número de células microgliales proinflamatorias

El perfil de activación de la microglía se determinó tras realizar la inmunohistoquímica de la proteína Iba1. Para ello, se evaluó de manera subjetiva la morfología y el cuerpo de cada una de las microglías activadas, agrupando



como proinflamatorias aquellas con un cuerpo celular grueso y ramificaciones cortas (Figura 6A). La cuantificación de células microgliales proinflamatorias representada se relativizó teniendo en cuenta el número total de microglías cuantificadas.

En ninguna de las tres regiones analizadas encontramos diferencias significativas a nivel de tratamiento ($F_{CM(1,3)}=0,5064$; $p=0,5280$ / $F_{CS(1,3)}=0,5427$; $p=0,5147$ / $F_{HP(1,3)}=0,1772$; $p=0,7021$) y de genotipo ($F_{CM(1,3)}=1,895$; $p=0,2624$ / $F_{CS(1,3)}=0,1490$; $p=0,7253$ / $F_{HP(1,3)}=0,4217$; $p=0,5624$) en el número de células proinflamatorias (Figura 6B).

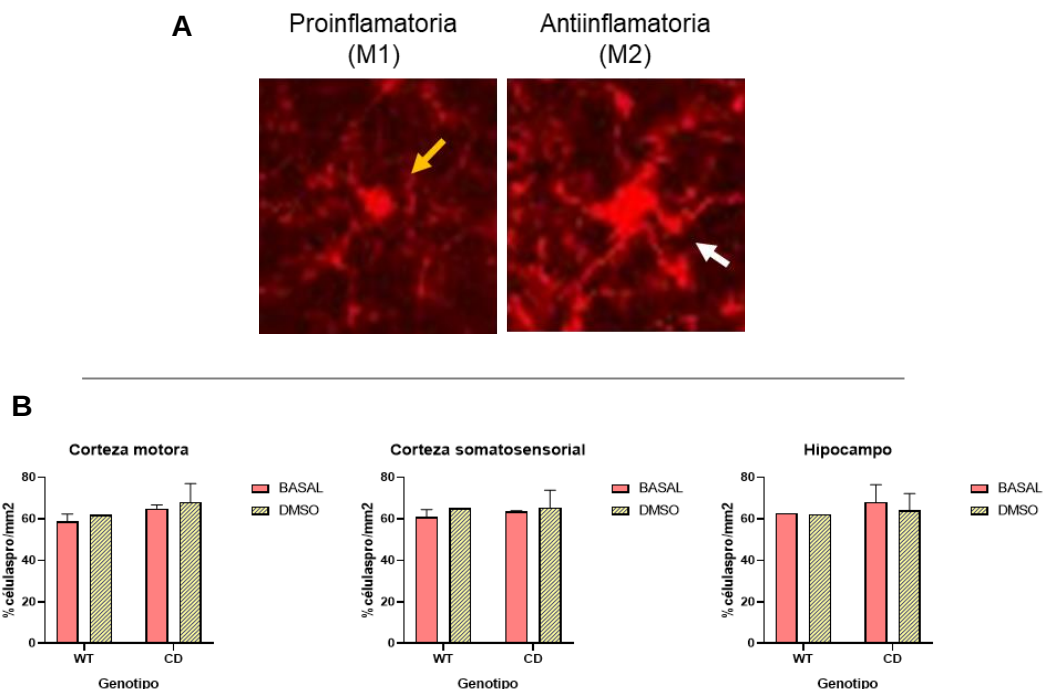


Figura 6. El DMSO no tiene efectos en el perfil de activación de las células microgliales del modelo murino CD y del modelo WT. (A) Ampliación de una imagen confocal de la región de la corteza motora tras una tinción inmunohistoquímica de la proteína Iba1, presente en las células microgliales. Se puede observar una célula proinflamatoria (flecha naranja), con un cuerpo celular grueso y ramificaciones cortas y una célula antiinflamatoria (flecha blanca), identificada por presentar ramificaciones largas. **(B)** Representación gráfica del porcentaje de células microgliales proinflamatorias por mm² de la corteza motora (CM), la corteza somatosensorial (CS) y el hipocampo (HP) del modelo murino CD y del modelo WT, ambos machos. No se obtuvieron diferencias significativas a nivel de tratamiento ($F_{CM(1,3)}=0,0004955$; $p=0,9836$ / $F_{CS(1,3)}=0,08111$; $p=0,7943$ / $F_{HP(1,3)}=0,1132$; $p=0,7587$) y genotipo ($F_{CM(1,3)}=1,895$; $p=0,2624$ / $F_{CS(1,3)}=0,1490$; $p=0,7253$ / $F_{HP(1,3)}=0,4217$; $p=0,5624$) en ninguna de las regiones.

7.3. No existen diferencias significativas en la cantidad de células microgliales entre machos basales y tratados con VER y CUR

Del mismo modo que en el estudio anterior, el número de células microgliales se determinó mediante la tinción inmunohistoquímica de la proteína Iba1 y su posterior cuantificación. Así mismo, para el análisis estadístico se realizó una ANOVA de dos vías de cada región. El grupo control de este estudio agrupa al grupo basal y al grupo tratado con DMSO al 1%, ya que, como se ha demostrado en el apartado anterior, no existen diferencias significativas entre ambos. En la representación este grupo se denomina como 'BASAL'.

Los resultados obtenidos muestran que no existen diferencias significativas a nivel de tratamiento ($F_{CM}(1,8)=3,383$; $p=0,1031$ / $F_{CS}(1,8)=4,177$; $p=0,0752$ / $F_{HP}(1,8)=1,351$; $p=0,2786$) y a nivel de genotipo ($F_{CM}(1,8)=1,873$; $p=0,20583$ / $F_{CS}(1,8)=1,769$; $p=0,2202$ / $F_{HP}(1,8)=3,402$; $p=0,1023$) en el número de células microgliales entre el grupo basal y el grupo tratado de ambos genotipos.

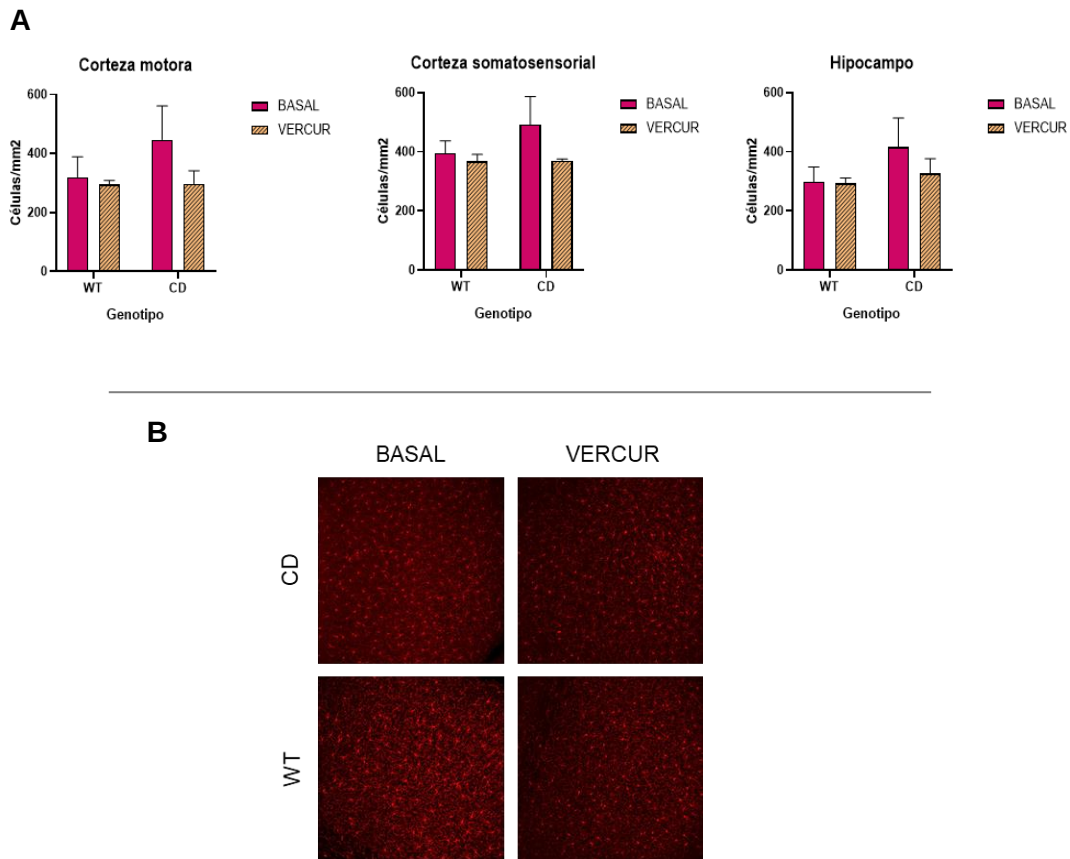


Figura 7. No existen diferencias significativas en la cantidad de células microgliales entre machos basales y tratados con VER y CUR. (A) Representación gráfica del número de células microgliales por mm² de la corteza motora (CM), la corteza somatosensorial (CS) y el hipocampo (HP) del modelo murino CD y del modelo WT en machos basales y con tratamiento. No se obtuvieron diferencias significativas a nivel de tratamiento ($F_{CM(1,8)}=1,6924$; $p=0,2292$ / $F_{CS(1,8)}=1,694$; $p=0,2293$ / $F_{HP(1,8)}=1,000$; $p=0,3465$) y genotipo ($F_{CM(1,8)}=1,873$; $p=0,20583$ / $F_{CS(1,8)}=1,769$; $p=0,2202$ / $F_{HP(1,8)}=3,402$; $p=0,1023$) entre ambos grupos. **(B)** Imagen confocal de la región de la corteza motora tras una tinción inmunohistoquímica de la proteína Iba1, presente en las células microgliales. Imágenes tomadas en machos del modelo murino CD y del modelo WT basales y tras el tratamiento combinado de VER y CUR. Se puede observar que ambos grupos presentan una cantidad de microglía similar.

7.4. Existen diferencias significativas en el número de células microgliales proinflamatorias entre los machos CD basales y los tratados con VER y CUR

Para cuantificar las células microgliales proinflamatorias se utilizó la misma metodología que en el estudio anterior. Así mismo, se representó el porcentaje de células microgliales proinflamatorias en relación con el número total de microglías de cada región (Figura 8A). Por último, se realizó el análisis estadístico por regiones mediante un ANOVA de dos vías y un Tukey post-hoc (* $p < 0.05$).

De igual modo que en el apartado anterior, el grupo denominado como 'BASAL' incluye al grupo basal y al grupo tratado DMSO al 1%.

En la región de la corteza motora, hay diferencias significativas debidas al genotipo ($F(1,8)=2,432$; $p=0,1575$) y al tratamiento ($F(1,8)=15,10$; $p=0,0046$). En el Tukey post-hoc observamos diferencias significativas entre WT (BASAL) vs CD (BASAL) con un p-valor de 0,0121 y entre CD (BASAL) y CD (VERCUR) con un p-valor de 0,0408.

En la región de la corteza somatosensorial, hay diferencias significativas debidas al tratamiento ($F(1,8)=17,98$; $p=0,0028$); sin embargo, no hay diferencias significativas debidas al genotipo ($F(1,8)=0,1464$; $p=0,7120$). En el Tukey post-hoc observamos diferencias significativas entre el grupo CD BASAL y VERCUR con un p-valor de 0,0204.

En la región del hipocampo, observamos, al igual que en la corteza motora, diferencias significativas debidas al genotipo ($F(1,8)=0,2437$; $p=0,6348$) y al tratamiento ($F(1,8)=23,17$; $p=0,0013$). En el Tukey post-hoc se ven diferencias significativas entre WT (BASAL) vs CD (BASAL) con un p-valor de 0,0139 y entre CD BASAL y VERCUR con un p-valor de 0,0206.

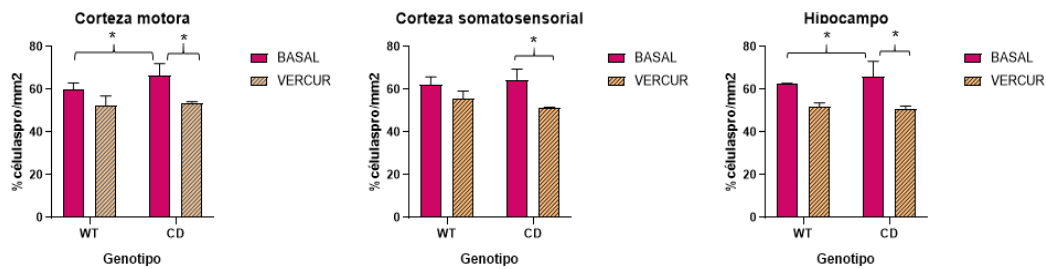


Figura 8. Existen diferencias significativas en el número de células microgliales entre los machos CD basales y los tratados con VER y CUR. Representación gráfica del porcentaje de células microgliales proinflamatorias por mm² de la corteza motora (CM), la corteza somatosensorial (CS) y el hipocampo (HP) del modelo murino CD y del modelo WT en machos basales y con tratamiento de VER y CUR. Se observan diferencias significativas debidas al tratamiento (ANOVA de dos vías) en la corteza motora, la corteza somatosensorial y el hipocampo ($F_{CM(1,8)}=15,10$; $p=0,0046$ / $F_{CS(1,8)}=17,98$; $p=0,0028$ / $F_{HP(1,8)}=23,17$; $p=0,0013$) entre los grupos CD basal y CD VERCUR. Así mismo, se obtuvieron diferencias significativas debidas al genotipo en la corteza motora ($F(1,8)=2,432$; $p=0,1575$) y en el hipocampo ($F(1,8)=0,2437$; $p=0,6348$), pero no en la corteza somatosensorial ($F(1,8)=0,1464$; $p=0,7120$) entre los grupos WT basal y CD basal. * $p<0.05$

7.5. No existen diferencias significativas en la cantidad de microglía entre machos y hembras tras el tratamiento combinado de VER y CUR

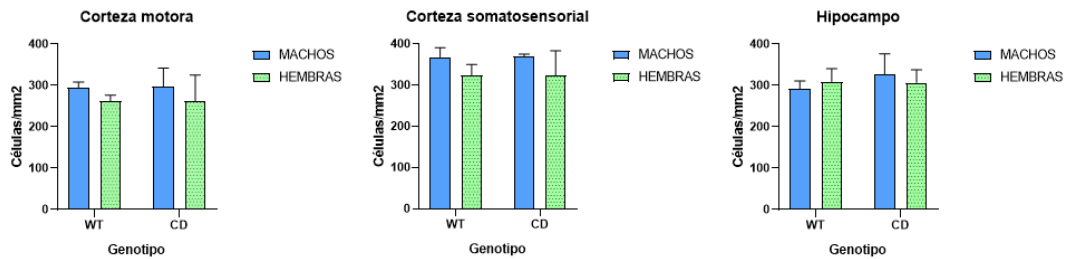
Debido a la situación actual no ha dado tiempo de analizar el grupo de hembras basales, de manera que no se pueden evaluar los efectos del tratamiento combinado de VER y CUR en éstas. Sin embargo, si podemos estudiar si el efecto del tratamiento es igual en machos y hembras.

De igual modo que en los estudios anteriores, el número de células microgliales se determinó mediante inmunohistoquímica de la proteína Iba1, con la posterior cuantificación y análisis estadístico (ANOVA de dos vías para cada región, Figura 9A).

Tras el análisis estadístico, observamos que no existen diferencias significativas ni debidas al genotipo ($F_{CM(1,10)}=0,001684$; $p=0,9681$ / $F_{CS(1,10)}=7,521^{005}$; $p=0,9933$ / $F_{HP(1,10)}=0,8132$; $p=0,3884$) ni al tratamiento ($F_{CM(1,10)}=1,916$; $p=0,1964$ / $F_{CS(1,10)}=3,558$; $p=0,0886$ / $F_{HP(1,10)}=0,01030$; $p=0,9212$) en el

número de células microgliales entre machos y hembras tratados en ninguna de las regiones evaluadas.

A



B

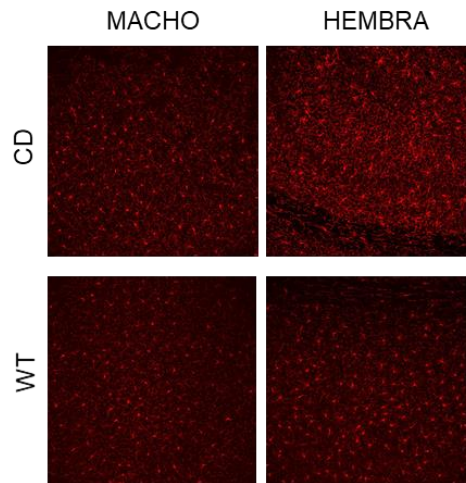


Figura 9. No existen diferencias significativas en la cantidad de microglía entre machos y hembras tras el tratamiento combinado de VER y CUR. (A) Representación gráfica del número de células microgliales por mm² de la corteza motora (CM), la corteza somatosensorial (CS) y el hipocampo (HP) del modelo murino CD y del modelo WT en hembras y machos. No existen diferencias significativas ni debidas al genotipo ($F_{CM(1,10)}=0,001684$; $p=0,9681$ / $F_{CS(1,10)}=7,521^{-005}$; $p=0,9933$ / $F_{HP(1,10)}=0,8132$; $p=0,3884$) ni al tratamiento ($F_{CM(1,10)}=1,916$; $p=0,1964$ / $F_{CS(1,10)}=3,558$; $p=0,0886$ / $F_{HP(1,10)}=0,01030$; $p=0,9212$) **(B)** Imagen confocal de la región de la corteza motora tras una tinción inmunohistoquímica de la proteína Iba1, presente en las células microgliales. Imágenes tomadas en machos y hembras del modelo murino CD y del modelo WT tras el tratamiento con VER y CUR.



7.6. No existen diferencias significativas en el número de células microgliales proinflamatorias entre machos y hembras tras el tratamiento combinado de VER y CUR

El número de células microgliales proinflamatorias se cuantificó, analizó y representó siguiendo la misma metodología que en los estudios anteriores (Figura 10). Tras realizar una ANOVA de dos vías, observamos que no existen diferencias significativas en el número de células proinflamatorias entre machos y hembras, ambos tratados, ni debidas al tratamiento ($F_{CM}(1,9)=0,03079$; $p=0,8646$ / $F_{CS}(1,9)=0,6545$; $p=0,4394$ / $F_{HP}(1,9)=0,1202$; $p=0,7367$) ni debidas al genotipo ($F_{CM}(1,9)=1,301$; $p=0,2835$ / $F_{CS}(1,9)=0,007913$; $p=0,9311$ / $F_{HP}(1,9)=2,862$; $p=0,1250$).

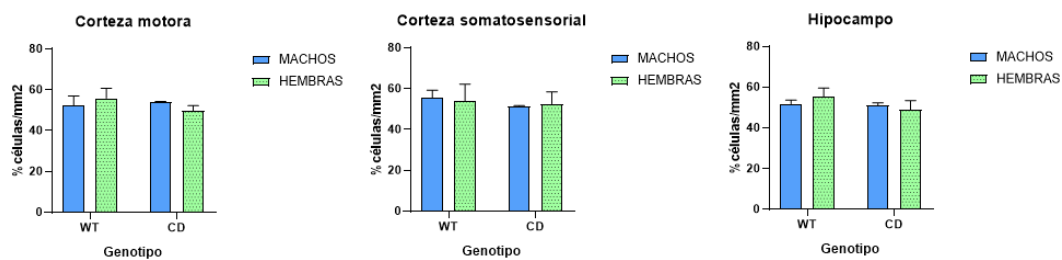


Figura 10. No existen diferencias significativas en el número de células microgliales proinflamatorias entre machos y hembras tras el tratamiento combinado de VER y CUR. (A) Representación gráfica del porcentaje de células microgliales proinflamatorias por mm² de la corteza motora (CM), la corteza somatosensorial (CS) y el hipocampo (HP) del modelo murino CD y del modelo WT en hembras y machos. No existen diferencias significativas en el número de células proinflamatorias entre machos y hembras ni debidas al tratamiento ($F_{CM}(1,9)=0,03079$; $p=0,8646$ / $F_{CS}(1,9)=0,6545$; $p=0,4394$ / $F_{HP}(1,9)=0,1202$; $p=0,7367$) ni debidas al genotipo ($F_{CM}(1,9)=1,301$; $p=0,2835$ / $F_{CS}(1,9)=0,007913$; $p=0,9311$ / $F_{HP}(1,9)=2,862$; $p=0,1250$).

8. Discusión

El WBS es un trastorno del desarrollo neurológico poco frecuente (Strømme *et al.*, 2002). Los pacientes WBS presentan un perfil cognitivo singular que incluye deficiencias severas en las habilidades visuoespaciales y de procesamiento facial y una personalidad hipersociable, junto a un lenguaje intacto (Jordan *et al.*, 2002; Bellugi *et al.*, 1999b).

Dada la complejidad del fenotipo cognitivo WBS, a menudo los pacientes requieren de la ayuda de un especialista mental para tratarlo. Sin embargo, el tratamiento es inespecífico y se basa únicamente en mejorar la ansiedad. Estos tratamientos se basan en medicamentos que se utilizan en la población general, cuya efectividad no ha sido evaluada en pacientes WBS. Por esta razón, es interesante estudiar cualquier tratamiento potencial que pueda mejorar el deterioro cognitivo observado en WBS.

En los últimos años, el estudio de los efectos terapéuticos de los polifenoles naturales ha ganado atención debido a sus propiedades beneficiosas a nivel cognitivo y cardiovascular (Ortiz-Romero *et al.*, 2018). De hecho, estudios recientes sitúan un tratamiento combinado de CUR, el fenol más abundante en la cúrcuma y VER, un medicamento ampliamente utilizado en la población común como un enfoque terapéutico prometedor para mejorar el fenotipo cognitivo de los pacientes con WBS (datos no publicados).

Por otro parte, se ha observado recientemente que la desregulación de las células microgliales tiene una elevada importancia en determinadas enfermedades neurodegenerativas. En condiciones fisiológicas normales, la activación microglial proporciona una defensa contra lesiones e infecciones (Hickman *et al.*, 2018). Sin embargo, la activación crónica o excesiva se considera el componente patológico principal de prácticamente todas las enfermedades neurodegenerativas, ya que la mayoría de ellas presentan procesos de sobreactivación de la microglía y neuroinflamación (Von Bernhardi, *et al.*, 2015). Es por ello por lo que la asociación entre la microglía y las enfermedades neurodegenerativas se ha convertido en el principal foco de investigación a la hora de buscar terapias hacia estas patologías (Chen *et al.*, 2016).



Cuando las células microgliales se activan, liberan una serie de factores neurotóxicos, incluidas citocinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 y óxido nítrico (NO), los cuales de manera crónica conducen a la pérdida y disfunción sináptica, así como a la muerte de las células neuronales (Orihuela *et al.*, 2016).

No existen estudios anteriores que evalúen la influencia microglial en las características conductuales de los pacientes WBS, ni la mejora de dicha inflamación tras el tratamiento con VER y CUR. Sin embargo, en otras enfermedades neurodegenerativas, sí que se ha evidenciado la regulación de la neuroinflamación tras el tratamiento con VER y CUR de forma separada (Liu *et al.*, 2011 y Tsai *et al.*, 2011).

La CUR es una molécula pleiotrópica que afecta a muchas vías de señalización con efectos sobre la microglía. En estudios anteriores se ha observado que, debido a su solubilidad en lípidos, es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) e inhibir la activación de la microglía (Tsai *et al.*, 2011). La CUR suprime la expresión de la óxido nítrico sintasa, encargada de sintetizar NO, así como la expresión de citocinas, como TNF- α , y el estrés oxidativo, lo cual conduce a efectos antiinflamatorios en la microglía.

Por otro lado, el VER, debido a su efecto en la modulación de los canales de Ca²⁺, se ha estudiado como un enfoque terapéutico para la inflamación mediada por la activación microglial. Sin embargo, los resultados han sido contradictorios. Por un lado, se ha descrito que el VER actúa como neuroprotector, suprimiendo la sobreactivación de la microglía inducida por LPS. Para ello, reduce la producción de superóxido y NO, causantes de estrés oxidativo, y de citocinas como TNF- α (Liu *et al.*, 2011). Sin embargo, Hashioka *et al.*, 2012, aplicando iguales concentraciones de LPS y verapamilo que Liu *et al.*, 2011, no obtuvieron diferencias significativas en la atenuación de la neurotoxicidad microglial, lo cual indica que la actividad neuroprotectora del VER no sólo depende de éste, sino que también depende de la especie y/o de las concentraciones de LPS aplicadas, es decir, de las concentraciones del inductor de la activación.

Un estudio reciente (datos no publicados) ha confirmado que el tratamiento combinado de VER y CUR mejora los rasgos conductuales WBS presentados por el modelo CD, teniendo en cuenta que el fenotipo neuroconductual de los ratones CD recapitula la mayoría de las características cognitivas observadas en

pacientes con WBS, como la hipersociabilidad o un comportamiento similar a la ansiedad (Segura-Puimedon *et al.*, 2014).

En este trabajo analizamos los efectos del tratamiento combinado de VER y CUR en la neuroinflamación, con el fin de evaluar la influencia de las células microgliales en las alteraciones neuroconductuales WBS, ya que la mejora en los rasgos conductuales CD observada podría deberse a una regulación de la inflamación microglial.

Según los resultados obtenidos, no observamos, ni en condiciones basales ni tras el tratamiento, diferencias significativas en el número de células microgliales totales a nivel de genotipo (WT y CD), lo cual significa que la cantidad de células microgliales es similar de manera normal entre ambos genotipos. Así mismo, tampoco se observaron diferencias significativas en el número total de células microgliales tras el tratamiento dentro de un grupo (WT o CD), por lo que podemos concluir que el tratamiento no modificó el número de células de microglía totales.

Por otro lado, el tratamiento disminuyó de manera significativa el porcentaje de células microgliales proinflamatorias en el modelo CD, lo que nos hace pensar que el tratamiento combinado presenta actividad antiinflamatoria. Así mismo, en condiciones basales, se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células microgliales proinflamatorias a nivel de genotipo (WT y CD); sin embargo, tras el tratamiento, no existen diferencias significativas a nivel de genotipo, lo cual significa que el tratamiento provoca que el porcentaje de células proinflamatorias en el modelo CD acabe siendo similar al del modelo WT.

Este porcentaje elevado de células proinflamatorias en el modelo CD en condiciones basales puede deberse a un proceso de microgliosis en el tejido cerebral dañado. La microgliosis es una reacción de las células gliales del sistema nervioso central en respuesta al daño. En la mayoría de los casos, implica la proliferación local de diferentes tipos de células gliales, incluidas las microglías (Li & Zhang, 2016).

No existen estudios que muestren la presencia de un proceso de microgliosis en pacientes con el síndrome de Williams-Beuren. Sin embargo, se ha comprobado la proliferación local de las células de la microglía proinflamatorias debido a un proceso de microgliosis en modelos de enfermedades neurodegenerativas



crónicas como el Alzheimer o enfermedades priónicas (Gómez-Nicola *et al.*, 2013). La activación microglial y el perfil de citocinas de estas enfermedades son similares a los observados en el modelo CD de WBS, por lo que podríamos pensar que la respuesta al daño cerebral implica microgliosis en pacientes WBS.

Por otro lado, nuestros resultados no han mostrado diferencias significativas en la cantidad de células microgliales totales ni células proinflamatorias entre machos y hembras, lo que indica que el efecto del tratamiento podría ser independiente del sexo. Sin embargo, sería necesario evaluar si las hembras basales siguen el mismo perfil que los machos de este grupo para confirmar esta hipótesis.

Como se ha comentado anteriormente, en un estudio previo (datos no publicados) se evaluaron los efectos del tratamiento combinado de VER y CUR en el fenotipo neuroconductual del modelo murino CD. Tras el tratamiento, se observaron mejorías en la descoordinación motora, en la ansiedad y en el comportamiento social. En los dos primeros, ninguno de los tratamientos tuvo un efecto positivo de manera individual, sino que fue el tratamiento combinado el que provocó la mejoría. Sin embargo, en el caso del comportamiento social, fue el tratamiento individual de los ratones CD con CUR el que tuvo un efecto positivo.

Debido a que la mayoría de las mejoras observadas en los rasgos conductuales WBS tras el tratamiento con VER y CUR se deben a una acción combinada de ambos, atribuimos los resultados obtenidos en nuestro estudio a una mezcla de las diferentes propiedades de cada molécula. De todos modos, sería necesario estudiar los componentes del tratamiento por separado para corroborar que los efectos se deben a una actuación combinada, ya que, como se ha comentado, diferentes estudios han afirmado que el tratamiento individual de ambos ha tenido efectos positivos en la inflamación microglial (Liu *et al.*, 2011 y Tsai *et al.*, 2011).

En definitiva, la inflamación microglial, como ocurre en otras enfermedades neurodegenerativas, presenta un efecto crucial en el daño y la degeneración cerebral del paciente WBS. Sugerimos que las alteraciones conductuales observadas en el modelo murino CD presentan un componente microglial, ya que la mejora de la inflamación microglial implica una mejora de los rasgos conductuales CD y viceversa. Un tratamiento que combina VER y CUR parece ser capaz de disminuir la inflamación microglial, siendo un enfoque terapéutico prometedor para mejorar el fenotipo cognitivo de los pacientes con WBS.

9. Conclusiones

Todas las conclusiones aquí presentadas son preliminares, ya que como se ha comentado, debido a la situación actual no ha dado tiempo de realizar el número de experimentos necesarios:

- 1.** No existen diferencias significativas en el número de células microgliales totales debidas al genotipo (WT vs CD) en machos basales (objetivo 1).
- 2.** En condiciones basales, existen diferencias significativas en el porcentaje de células proinflamatorias entre el modelo murino CD y WT tanto en la corteza motora como en el hipocampo (objetivo 2).
- 3.** Tras el tratamiento combinado de VER y CUR, no se observan diferencias significativas en la cantidad de células microgliales entre el modelo murino CD basal y tratado (objetivo 3).
- 4.** Así mismo, existen diferencias significativas en el número de células microgliales proinflamatorias entre los machos CD basales y los tratados con VER y CUR en todas las regiones cerebrales evaluadas (objetivo 4).



10. Bibliografía

Babu A, Prasanth KG, Balaji B. Effect of curcumin in mice model of vincristine-induced neuropathy. *Pharm Biol.* 2015 Jun 3;53(6):838–48.

Bellugi U, Mills D, Jernigan T, Hickok G, Galaburda A. Linking cognition, brain structure, and brain function in Williams syndrome. *Neurodevelopmental disorders.* 1999b: 111-136.

Biala G, Kruk M. Calcium channel antagonists suppress cross-tolerance to the anxiogenic effects of d-amphetamine and nicotine in the mouse elevated plus maze test. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry.* 2008 Jan;32(1):54–61.

Borralleras C, Sahun I, Pérez-Jurado LA, Campuzano V. Intracisternal Gtf2i Gene Therapy Ameliorates Deficits in Cognition and Synaptic Plasticity of a Mouse Model of Williams–Beuren Syndrome. *Mol Ther.* 2015 Nov;23(11):1691–9.

Burch TM, McGowan FX, Kussman BD, Powell AJ, DiNardo JA. Congenital Supravalvular Aortic Stenosis and Sudden Death Associated with Anesthesia: What's the Mystery? *Anesth Analg.* 2008 Dec;107(6):1848–54.

CHEN W-W, ZHANG X, HUANG W-J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep.* 2016 Apr;13(4):3391–6.

Chiang M-C, Reiss AL, Lee AD, Bellugi U, Galaburda AM, Korenberg JR, et al. 3D pattern of brain abnormalities in Williams syndrome visualized using tensor-based morphometry. *Neuroimage.* 2007 Jul;36(4):1096–109.

Del Campo M, Antonell A, Magano LF, Muñoz FJ, Flores R, Bayés M, et al. Hemizygoty at the NCF1 Gene in Patients with Williams-Beuren Syndrome Decreases Their Risk of Hypertension. *Am J Hum Genet.* 2006 Apr;78(4):533–42.

DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem.* 2016 Oct;139:136–53.

Eggen BJL, Raj D, Hanisch U-K, Boddeke HWGM. Microglial Phenotype and Adaptation. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2013 Sep 25;8(4):807–23.

Gilhotra N, Dhingra D. GABAergic and nitriergic modulation by curcumin for its antianxiety-like activity in mice. *Brain Res.* 2010 Sep;1352:167–75.

Gómez-Nicola D, Fransen NL, Suzzi S, Perry VH. Regulation of Microglial Proliferation during Chronic Neurodegeneration. *J Neurosci.* 2013 Feb 6;33(6):2481–93.

Gopala Krishna HN, Kumar KB, Karanth KS. The anxiolytic activity of calcium channel antagonists in experimental models of anxiety in rats. *Indian J Pharmacol.* 2001; 2014 Sep;33(4):267-271.

Hallidie-Smith KA, Karas S. Cardiac anomalies in Williams-Beuren syndrome. *Arch Dis Child.* 1988 Jul 1;63(7):809–13.

Hashioka S, Klegeris A, McGeer PL. Inhibition of human astrocyte and microglia neurotoxicity by calcium channel blockers. *Neuropharmacology.* 2012 Sep;63(4):685–91.

Hay E, Lucariello A, Contieri M, Esposito T, De Luca A, Guerra G, et al. Therapeutic effects of turmeric in several diseases: An overview. *Chem Biol Interact.* 2019 Sep;310:108729.

Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018 Oct 26;21(10):1359–69.

Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol Brain Res.* 1998 Jun;57(1):1–9.

Jackowski AP, Rando K, Maria de Araújo C, Del Cole CG, Silva I, Tavares de Lacerda AL. Brain abnormalities in Williams syndrome: A review of structural and functional magnetic resonance imaging findings. *Eur J Paediatr Neurol.* 2009 Jul;13(4):305–16.

Jones W, Bellugi U, Lai Z, Chiles M, Reilly J, Lincoln A, et al. II. Hypersociability in Williams Syndrome. *J Cogn Neurosci.* 2000 Mar;12(supplement 1):30–46.



Jordan H, Reiss JE, Hoffman JE, Landau B. Intact Perception of Biological Motion in the Face of Profound Spatial Deficits: Williams Syndrome. *Psychol Sci.* 2002 Mar 6;13(2):162–7.

Kong DH, Kim YK, Kim MR, Jang JH, Lee S. Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 2;19(4):1057.

Levitin DJ, Menon V, Schmitt JE, Eliez S, White CD, Glover GH, et al. Neural Correlates of Auditory Perception in Williams Syndrome: An fMRI Study. *Neuroimage.* 2003 Jan;18(1):74–82.

Li T, Zhang S. Microgliosis in the Injured Brain. *Neurosci.* 2016 Apr 11;22(2):165–70.

Liu Y, Lo Y-C, Qian L, Crews FT, Wilson B, Chen H-L, et al. Verapamil protects dopaminergic neuron damage through a novel anti-inflammatory mechanism by inhibition of microglial activation. *Neuropharmacology.* 2011 Feb;60(2–3):373–80.

Martens MA, Seyfer DL, Andridge RR, Foster JEA, Chowdhury M, McClure KE, et al. Parent report of antidepressant, anxiolytic, and antipsychotic medication use in individuals with Williams syndrome: Effectiveness and adverse effects. *Res Dev Disabil.* 2012 Nov;33(6):2106–21.

Mroczko B, Koper OM, Groblewska M, Zboch M, Kulczynska-Przybik A, Szmikowski M, et al. P2-136: MATRIX METALLOPROTEINASE-9 (MMP-9) AND ITS TISSUE INHIBITOR-1 (TIMP-1) AS BIOMARKERS OF ALZHEIMER'S DISEASE. *Alzheimer's Dement.* 2014 Jul;10:P520–P520.

Morris CA. Introduction: Williams syndrome. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet.* 2010 May 15;154C(2):203–8.

Morris CA, Mervis CB. Williams syndrome and related disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2000 Sep;1(1):461–84.

Nimmerjahn A. Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science (80-).* 2005 May 27;308(5726):1314–8.

Numakawa T, Odaka H, Adachi N. Actions of Brain-Derived Neurotrophin Factor in the Neurogenesis and Neuronal Function, and Its Involvement in the Pathophysiology of Brain Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 19;19(11):3650.

Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ. Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*. 2016 Feb;173(4):649–65.

Ortiz-Romero P, Borralleras C, Bosch-Morató M, Guivernau B, Albericio G, Muñoz FJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate improves cardiac hypertrophy and short-term memory deficits in a Williams-Beuren syndrome mouse model. da Costa Martins PA, editor. *PLoS One*. 2018 Mar 19;13(3):e0194476.

Osborne LR, Li M, Pober B, Chitayat D, Bodurtha J, Mandel A, et al. A 1.5 million–base pair inversion polymorphism in families with Williams-Beuren syndrome. *Nat Genet*. 2001 Nov 29;29(3):321–5.

Peoples R, Franke Y, Wang Y-K, Pérez-Jurado L, Paperna T, Cisco M, et al. A Physical Map, Including a BAC/PAC Clone Contig, of the Williams-Beuren Syndrome–Deletion Region at 7q11.23. *Am J Hum Genet*. 2000 Jan;66(1):47–68.

Pober BR. Williams–Beuren Syndrome. *N Engl J Med*. 2010 Jan 21;362(3):239–52.

Pober BR, Dykens EM. Williams Syndrome: An Overview of Medical, Cognitive, and Behavioral Features. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 1996 Oct;5(4):929–43.

Pober BR, Johnson M, Urban Z. Mechanisms and treatment of cardiovascular disease in Williams-Beuren syndrome. *J Clin Invest*. 2008 May 1;118(5):1606–15.

Quartermain D, Garcia deSoria V. The Effects of Calcium Channel Antagonists on Short- and Long-Term Retention in Mice Using Spontaneous Alternation Behavior. *Neurobiol Learn Mem*. 2001 Jul;76(1):117–24.

Ransohoff RM, Perry VH. Microglial Physiology: Unique Stimuli, Specialized Responses. *Annu Rev Immunol*. 2009 Apr;27(1):119–45.



Reinecke K, Herdegen T, Eminel S, Aldenhoff JB, Schiffelholz T. Knockout of c-Jun N-terminal kinases 1, 2 or 3 isoforms induces behavioural changes. *Behav Brain Res*. 2013 May;245:88–95.

Sadler LS, Robinson LK, Verdaasdonk KR, Gingell R. The Williams syndrome: Evidence for possible autosomal dominant inheritance. *Am J Med Genet*. 1993 Sep 15;47(4):468–70.

Scheider C, Segre T. Green tea: Potential health benefits. *Am Fam Physician*. 2009 Apr 1;79(7):591-594.

Segura-Puimedon M, Sahún I, Velot E, Dubus P, Borralleras C, Rodrigues AJ, et al. Heterozygous deletion of the Williams–Beuren syndrome critical interval in mice recapitulates most features of the human disorder. *Hum Mol Genet*. 2014 Dec 15;23(24):6481–94.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest*. 2012 Mar 1;122(3):787–95.

Song I, Dityatev A. Crosstalk between glia, extracellular matrix and neurons. *Brain Res Bull*. 2018 Jan;136:101–8.

Strømme P, Bjørnstad PG, Ramstad K. Prevalence Estimation of Williams Syndrome. *J Child Neurol*. 2002 Apr 2;17(4):269–71.

Tam E, Young EJ, Morris CA, Marshall CR, Loo W, Scherer SW, et al. The common inversion of the Williams–Beuren syndrome region at 7q11.23 does not cause clinical symptoms. *Am J Med Genet Part A*. 2008 Jul 15;146A(14):1797–806.

Tsai Y-M, Chien C-F, Lin L-C, Tsai T-H. Curcumin and its nano-formulation: The kinetics of tissue distribution and blood–brain barrier penetration. *Int J Pharm*. 2011 Sep;416(1):331–8.

Urban Z, Helms C, Fekete G, Csiszar K, Bonnet D, Munnich A et al. 7q11.23 Deletions in Williams syndrome arise as a consequence of unequal meiotic crossover [1]. *Am J Hum Genet*. 1996 Oct 10;59(4):958-962.

Valero MC, de Luis O, Cruces J, Pérez Jurado LA. Fine-Scale Comparative Mapping of the Human 7q11.23 Region and the Orthologous Region on Mouse Chromosome 5G: The Low-Copy Repeats That Flank the Williams–Beuren Syndrome Deletion Arose at Breakpoint Sites of an Evolutionary Inversion(s). *Genomics*. 2000 Oct;69(1):1–13.

Van der Aa N, Rooms L, Vandeweyer G, van den Ende J, Reyniers E, Fichera M, et al. Fourteen new cases contribute to the characterization of the 7q11.23 microduplication syndrome. *Eur J Med Genet*. 2009 Mar;52(2–3):94–100.

Von Bernhardi R, Eugénín-von Bernhardi L, Eugénín J. Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*. 2015;7.



11. Valoración personal

Personalmente, formar parte de este grupo de investigación ha sido una experiencia muy enriquecedora, tanto por los conocimientos aprendidos, como por el apoyo y confianza mostrado por el grupo.

En primer lugar, me gustaría agradecer a todos los componentes del grupo, en especial, a mi tutora, Victoria Campuzano, por haberme tratado como una más desde el minuto uno de mi llegada al grupo y a Paula Ortiz, por haber tenido toda la paciencia del mundo enseñándome a realizar cada una de las técnicas y haber puesto una confianza enorme en mí.

Me da mucha pena no haber podido disfrutar de toda la estancia de prácticas planeada, porque estoy segura de que habría aprendido y mejorado mi técnica muchísimo. Sin embargo, me quedo con la parte positiva, ya que en el tiempo que estuve con ellas pude poner en práctica conocimientos teóricos adquiridos durante la carrera y aprender nuevas técnicas, tanto para los experimentos *in vitro* e *in vivo*, como de histología y biología molecular. Desde el primer día me encontré involucrada en la rutina del laboratorio, y todos los miembros del laboratorio fueran de mi grupo o no, me acogieron como una más, hecho que me hizo tener una actitud positiva para trabajar y seguir aprendiendo día a día.

Así mismo, les quiero dar las gracias por guiarme y ayudarme a realizar este trabajo de fin de grado, ya que, aun siendo una situación complicada, han estado siempre atentas a cada una de mis dudas, enseñándome a distancia cómo analizar los datos y plasmar las conclusiones obtenidas, entre muchas otras cosas.

En definitiva, trabajar en el grupo y realizar el trabajo ha sido una experiencia muy positiva para mí, porque, además de servirme para poner en práctica muchas de las técnicas aprendidas durante la carrera, me ha permitido mejorar mis habilidades de laboratorio y de análisis, siendo cada vez más eficiente y segura de mí misma.

12. Anexos

GEN	SECUENCIA PRIMERS	T _M (°C)	TAMAÑO (bp)
HPRT	F CTCTGAGGCTTCAAAGGTTC	60.6	±300
	R AATCCAGCTTGTTTGGGCTA	63.4	
IMR	F GTCAGTCGAGTGCACAGTTT	56.4	206
	R CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	57.7	

Tabla 2. Secuencia del *primer forward* (F) y *reverse* (R) para los genes HPRT e IMR de genotipado. Los *primers* F y R del gen HPRT tienen una temperatura de melting de 60.6 °C y 63.4 °C, respectivamente, y dan lugar a un amplicón de ±300 bp. Así mismo, los *primers* F y R del gen IMR tienen una temperatura de melting de 56.4 °C y 57.7 °C, respectivamente, y dan lugar a un amplicón de 206 bp.