



TRABAJO FIN DE GRADO
DE CARÁCTER EXPERIMENTAL

PAPEL DE LA MICROGLÍA ASOCIADA A NEURODEGENERACIÓN EN UN MODELO ATÁXICO



María de los Santos Letrán Sánchez

Grado en Farmacia

Facultad de Farmacia · Universidad de Sevilla

Curso 2022/2023



TRABAJO FIN DE GRADO
DE CARÁCTER EXPERIMENTAL

PAPEL DE LA MICROGLÍA ASOCIADA A NEURODEGENERACIÓN EN UN MODELO ATÁXICO

María de los Santos Letrán Sánchez

Grado en Farmacia

Facultad de Farmacia · Universidad de Sevilla

Curso 2022/2023

Tutora - Dra. Rocío Ruiz Laza

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

AGRADECIMIENTOS

Me siento afortunada, esta etapa que hoy culmina me ha dejado una huella en el alma, y es por todas las personas que me han acompañado durante el camino en el que he tenido la enorme oportunidad de aportar mi granito de arena. La felicidad sólo es real cuando se comparte, por eso, me gustaría agradecerlos todos aquellos momentos que me habéis regalado durante estos cinco intensos años.

Gracias Rocío por transmitirme esa inmensa pasión que tienes por la ciencia desde el primer día que coincidimos en clase y por brindarme tu confianza durante estos años en los que he tenido la suerte de ser tu alumna interna y realizar este trabajo bajo tu tutela. Gracias por creer siempre en mí y hacerme sentir valiosa. A ti Paco, por guiarme en cada paso que he dado durante este tiempo, por hacerme disfrutar de cada instante y por enseñarme a confiar en mí misma. Por encima de todo esto, quiero agradecerte que hayas estado a mi lado, has sido luz y has sabido cómo sacarme una sonrisa, especialmente en aquellos momentos más duros. Gracias Alberto por preocuparte tanto, por tener siempre unas bonitas palabras para mí y por ofrecerme ese abrazo cuando más lo necesitaba. A ti Sonia, por ser más que amiga, mi mitad, por haber compartido todo este tiempo conmigo, por darme tantas anécdotas que contar y por aportarme esa seguridad que en muchas ocasiones me falta. A vosotros y a todos los que formáis parte del laboratorio BIO-113, gracias por abrirnos las puertas y permitirnos dar nuestros primeros pasos en la investigación, por compartir vuestro precioso trabajo y hacer que nos emocione la Neurociencia. Gracias por ser familia.

También me gustaría dar las gracias a todos los que han sido compañeros y ahora son amigos. A los que han estado junto a mi durante la carrera, a los que llegaron más tarde, y a los que, por casualidad, he conocido hace poco. Gracias por hacerme más fácil el recorrido enseñándome a disfrutar de él y por contagiarme de vuestra alegría infinita. A cada uno de vosotros, os guardo un hueco en mi corazón para siempre.

Por último, me gustaría agradecer a mis abuelos, por haberme educado en valores, por su dedicación, esfuerzo y entrega. A Raúl, por ser cómplice, por saber escucharme y por orientarme en cada rumbo que tomo en la vida. Y a ti mamá, gracias por mostrarme tu orgullo y admiración a través de esos ojos brillantes que llevaré eternamente en el recuerdo, y por darme fuerzas para seguir luchando por conseguir mis sueños.

A los que, por suerte, puedo abrazar con fuerza
y a los que no están, pero sé que no me sueltan de la mano,
Gracias de verdad.

RESUMEN

La mutación autosómica recesiva Gly483Glu, que ocurre espontáneamente en la proteína murina Herc1, conduce a su sobreexpresión en el cerebelo del ratón *tambaleante* (*tbl*). Esto provoca un descontrol de la muerte por autofagia de las células de Purkinje a partir de los dos meses de edad, así como una desregulación de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR encargada de la correcta mielinización axonal. Ambas situaciones desencadenan la aparición de un síndrome neuromuscular atáxico caracterizado por alteraciones en el control motor. Ante esta perturbación homeostática, incluso antes de que ocurra la muerte de las células de Purkinje, la microglía presente en el cerebelo es capaz de iniciar una potente respuesta inmunitaria adquiriendo un perfil de fenotipo DAM con una sobreexpresión de Galectina-3 (Gal3).

Con el objetivo de estudiar el papel de esta microglía en el proceso degenerativo que tiene como consecuencia la muerte de las células de Purkinje en el modelo *tbl*, se ha eliminado el gen *Igals3* para suprimir la expresión de Gal3. Una vez generado el nuevo modelo murino, se cuantificaron mediante inmunohistoquímica las células de Purkinje y la densidad que ocupaban en el cerebelo de ratones de dos meses en muestras procedentes de tres grupos experimentales, WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO, así como el número de células microgliales presentes en la corteza y en la sustancia blanca de las secciones coronales de los mismos. Así se confirmó la hipótesis inicial en tanto que, al suprimir la expresión de Gal3, se recuperaba parcialmente la población de células de Purkinje. No se observaron cambios en la cantidad de células microgliales entre los grupos *tbl* y *tbl*/Gal3KO, pero sí entre ambos y el WT presentando los grupos experimentales una mayor cantidad en comparación con el control, siendo esta diferencia mayor en corteza a causa de la respuesta inflamatoria originada por el daño neuronal.

PALABRAS CLAVE

HERC1, *tambaleante*, Purkinje, Galectina-3, microglía

ÍNDICE

RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	3
INTRODUCCIÓN	5
Sistema Nervioso Central (SNC) y el movimiento	5
Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)	6
Proteínas HERC	7
Ratones <i>tambaleantes</i>	10
Manifestaciones clínicas	12
Microglía asociada a enfermedad (DAM)	13
Galectina-3 (Gal3)	14
OBJETIVOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Animales experimentales	17
Obtención y preparación de muestras	18
Inmunohistoquímica (IHC)	19
Adquisición y análisis de imágenes	21
IHC con anticuerpo primario Anti-Calbindin	21
IHC con anticuerpo primario Anti-Iba1	22
Análisis estadístico	23
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24
Distribución de células de Purkinje y microglía en el eje anteroposterior del cerebelo	24
Cuantificación de células de Purkinje	26
Variación de la densidad de células de Purkinje (%) con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm ²)	28
Cuantificación de microglía	29
Corteza cerebelosa	30
Sustancia blanca cerebelosa	31
Variación de la cantidad de microglía en corteza con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm ²) y a la densidad de células de Purkinje (%)	33
Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm ²) y a la densidad de células de Purkinje (%)	34
Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto a la cantidad de microglía en corteza por área medida (mm ²)	35
CONCLUSIONES	37
ABREVIATURAS	38
BIBLIOGRAFÍA	39

INTRODUCCIÓN

Desde finales del siglo XIX, gracias a los avances científicos que han tenido lugar hasta día de hoy, la esperanza de vida ha aumentado a un ritmo considerablemente rápido, lo que ha impulsado la aparición de una población notablemente envejecida con una alta tasa de morbilidad. Por esta razón, las enfermedades neurodegenerativas presentan cada vez una mayor incidencia en dicha población y, como consecuencia, suponen un impacto sociosanitario y económico verdaderamente relevante. La ciencia se está ocupando de investigar el origen de estas patologías con el objetivo de evitar, retardar su aparición y mejorar la calidad de vida de los pacientes, pero aún queda una gran parte etiológica que sigue siendo desconocida.

El modelo murino *tambaleante (tbl)* utilizado para la realización de este estudio presenta un síndrome complejo de ataxia caracterizado por alteraciones en el control motor como consecuencia de la degeneración y muerte de las células de Purkinje en el cerebelo (Bachiller et al., 2020). Este modelo nos permitirá estudiar el papel de la microglía en la degeneración y muerte de las células de Purkinje.

Sistema Nervioso Central (SNC) y el movimiento

El cerebelo es la porción del encéfalo ubicada en la parte posterior del cráneo, entre el cerebro y el tronco encefálico, encargada principalmente de la función motora del organismo. En el corte histológico transversal (Figura 1), se pueden observar dos capas bien diferenciadas que forman surcos a lo largo de toda la estructura, la sustancia gris y blanca. La sustancia gris está constituida por la corteza, que es la capa más superficial, y hacia el interior de la misma se disponen la capa molecular, un estrato de células de Purkinje y la capa granular. Las células de Purkinje se encuentran bordeando la capa granular y proyectan su árbol dendrítico hacia la capa molecular donde se colocalizan con otras células neurogliales como las neuronas estrelladas y en cesta. Su axón atraviesa la capa granular hasta alcanzar la sustancia blanca donde se mieliniza para realizar la sinapsis con otras neuronas que componen los núcleos intracerebelosos (Treuting et al., 2017). Por otra parte, la sustancia blanca está formada fundamentalmente por axones recubiertos de vainas de mielina, una estructura multilaminar rica en lípidos que es generada por los oligodendrocitos para facilitar la transmisión del impulso nervioso, y que es la que confiere el color blanco a esta región cerebelar (Safaiyan et al., 2021). Dadas las similitudes en la histología cerebelar entre ratones y humanos, se utilizan modelos murinos para estudiar la fisiopatología humana de esta estructura encefálica.

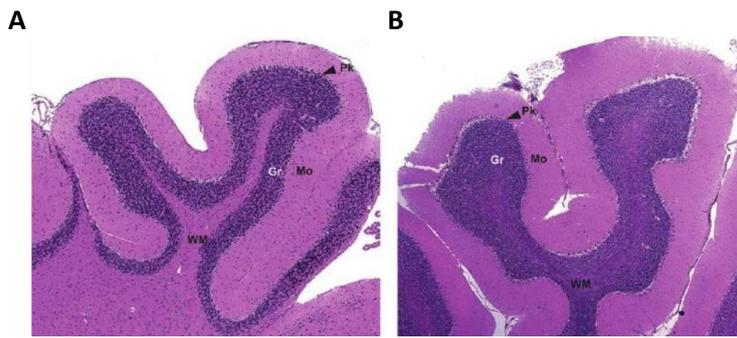


Figura 1. Corte histológico del cerebelo de ratón (A) y humano (B) (Treuting et al., 2017). Capa molecular (Mo), estrato de células de Purkinje (Pk), capa granular (Gr) y sustancia blanca (WM).

El cerebelo forma parte del Sistema Nervioso Central (SNC) y funciona como un centro de coordinación encargado de integrar la información que obtiene del Sistema Nervioso Periférico (SNP) a partir de los nervios sensitivos sobre la posición del cuerpo y su movimiento, y proporcionar señales nerviosas a los nervios motores con el objetivo de controlar la marcha y el equilibrio (Mashimo et al., 2009). Además, Dow y Moruzzi, en 1958, plantearon la hipótesis de que el cerebelo no solo controla el movimiento como tal, sino que contribuye al aprendizaje motor asociativo que asegura que los movimientos sean precisos y correctos, y posteriormente Marr, en 1969, localizó esta función propiamente en la corteza cerebelosa (Marr, 1969).

Los movimientos voluntarios, por muy sencillos que sean, requieren de la interacción coordinada de múltiples estructuras que forman parte de la unión neuromuscular (UNM) ya que las conexiones que se establecen entre ellas son altamente especializadas. La UNM se compone de una motoneurona (MN) en la zona presináptica, cuyo soma se encuentra en el asta ventral de la médula espinal, una fibra muscular o placa motora terminal en la zona postsináptica y una célula de Schwann que actúa como soporte para las capas de mielina encargadas de transmitir el impulso nervioso saltatorio a través de los nódulos de Ranvier. Durante la sinapsis, cuando un potencial de acción llega a la zona presináptica, se libera acetilcolina como neurotransmisor a la hendidura sináptica, donde interacciona con los receptores nicotínicos localizados en la zona postsináptica. Esto provoca la entrada de cationes y el inicio de una despolarización, con la consecuente apertura de canales de sodio voltaje-dependientes en la membrana de la fibra muscular que desencadena el proceso de contracción muscular (Bachiller et al., 2020).

Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS)

Tanto el desarrollo como la homeostasis de este sofisticado mecanismo requieren de la coordinación de un gran número de proteínas que son codificadas por distintos genes que

controlan la histogénesis, diferenciación y muerte celular dentro del Sistema Nervioso. Para asegurar que las proteínas implicadas funcionan correctamente debe mantenerse la proteostasis, lo que significa que debe haber un balance entre las proteínas recién formadas y las proteínas envejecidas o mal plegadas. Para lograr este equilibrio es fundamental el proceso de degradación proteica, llevado a cabo principalmente por las vías de autofagia/lisosoma y proteasoma (Pérez-Villegas et al., 2022).

La mayoría de las enfermedades neurodegenerativas cursan con una alteración de la homeostasis proteica, que podría ser debido a un fallo en el Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) (Figura 2). El mecanismo de ubiquitinación está implicado en ambas vías de degradación proteica, entre otras muchas funciones. Un defecto en el funcionamiento de éste conlleva la acumulación de proteínas envejecidas y mal plegadas y, por ende, una disminución en la calidad de las proteínas que participan en la transmisión del impulso nervioso. Por este motivo, el UPS resulta una diana de gran interés para el estudio e investigación de enfermedades neurodegenerativas (Bachiller et al., 2020).

En el UPS están involucrados tres grupos de enzimas, enzimas activadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y enzimas ligasas de ubiquitina (E3), que llevan a cabo una cascada de reacciones catalíticas para ubiquitinar, etiquetar y translocar, respectivamente, las proteínas defectuosas hacia el proteasoma para su posterior degradación y renovación a proteínas funcionales (Bachiller et al., 2015, 2020).

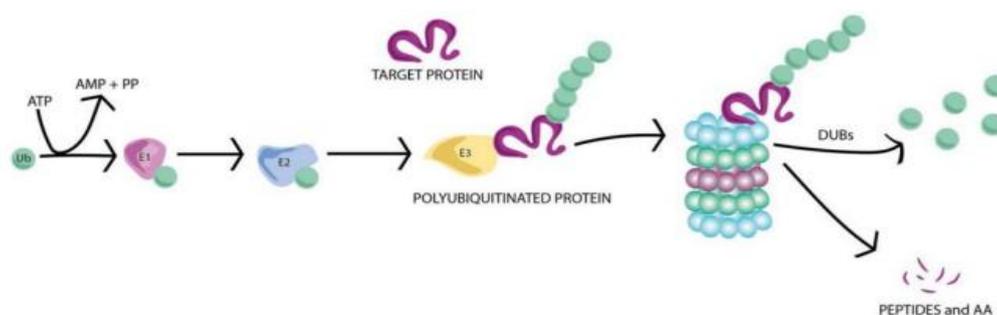


Figura 2. Esquema del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS) (Bachiller et al., 2020).

La enzima E1, en una reacción dependiente de ATP, activa a una molécula de ubiquitina (Ub). Posteriormente, la ubiquitina activada se conjuga con la enzima E2 para poder ser transferida por la enzima E3 a la proteína diana. Este proceso se repite varias veces hasta conseguir que la proteína esté poliubiquitinada y pueda ser reconocida por el proteasoma para su degradación en péptidos y aminoácidos. Finalmente, las enzimas desubiquitinizantes (DUBs) son las encargadas de desensamblar la cadena de poliubiquitina para que la ubiquitina en su forma monomérica pueda ser reciclada (Bachiller et al., 2020).

Proteínas HERC

Las proteínas HERC pertenecen a una de las tres subfamilias de enzimas ligasas de ubiquitina (E3) que actúan en la tercera etapa del proceso de ubiquitinación reconociendo la proteína diana

y catalizando la adición de las moléculas de ubiquitina unidas a E2 a dicho sustrato. Existen seis genes distintos que codifican proteínas HERC en humanos, no obstante, este trabajo se centra en estudiar uno de ellos, aquel que codifica la proteína HERC1 (Mashimo et al., 2009; Pérez-Villegas et al., 2022).

HERC1, al principio denominada p619 y más tarde p532, fue la primera proteína de la familia en ser identificada a través de un cribado que se realizó para la búsqueda de secuencias oncogénicas humanas relacionadas con el cáncer de mama (García-Gonzalo & Rosa, 2005). Se trata de una proteína de gran tamaño con casi 5000 residuos de aminoácidos en una sola cadena polipeptídica, 4861 aminoácidos en *Homo sapiens* -Hs- y 4859 en *Mus musculus* -Mm-, y con un peso molecular superior a 520 kDa (Pérez-Villegas et al., 2022).

Las seis proteínas HERC tienen en común la presencia de un dominio HECT (del inglés, *Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus*) y, como mínimo, un dominio RLD (del inglés, *Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) Like Domain*) (Mashimo et al., 2009; Pérez-Villegas et al., 2022). El primero de ellos tiene una estructura bilobulada y se encarga propiamente de transferir Ub o proteínas similares a ella a proteínas diana para que pueda tener lugar el proceso de degradación proteica (Mashimo et al., 2009). En un principio, se pensaba que era específico para la degradación de p53, no obstante, estudios posteriores han demostrado que la actividad ligasa de ubiquitina no está restringida a condiciones patológicas en las que se expresa p53 sino que también se desarrolla en condiciones fisiológicas durante el proceso de ubiquitinación de otras proteínas diana (García-Gonzalo et al., 2005). Sin embargo, el segundo tipo de dominio está constituido por siete secciones de hojas β -plegadas, actúa como factor intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF, del inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*) y está implicado en el intercambio de nucleótidos de guanina entre proteínas con sitio de unión a GTP. Además, parece ser más versátil ya que presenta la capacidad de interactuar con diversas proteínas como clatrina, ARF y Rab, y con lípidos como 4,5-fosfatidilinositol que juegan un relevante papel en el tráfico de membranas de las células (Pérez-Villegas et al., 2022).

La proteína HERC1 (Figura 3), además de un dominio HECT y dos dominios RLD, RLD1 y RLD2, presenta otras características estructurales que la diferencia funcionalmente de las otras cinco proteínas HERC. Contiene un dominio SRPY (del inglés, *sp1 A and RyR*), un dominio BH3 (del inglés, *Bcl-2 Homology Domain 3*), siete repeticiones de WD40 características de la subunidad β de las proteínas G heterodiméricas, una cremallera de leucina, secuencias ricas en prolina que se unen a SH3 y varias cadenas laterales de carácter polar y ácido (Pérez-Villegas et al., 2022).

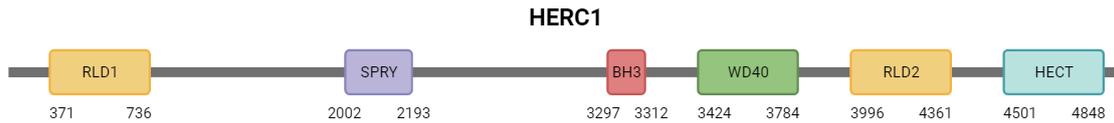


Figura 3. Estructura de la proteína HERC1. Basada en (García-Cano et al., 2019). [Creada en BioRender.com] La proteína HERC1 está formada por un dominio HECT, dos dominios RLD, RLD1 y RLD2, un dominio SPRY, un dominio BH3, siete repeticiones de WD40 características de la subunidad β de las proteínas G heterodiméricas entre otras secuencias aminoacídicas de menor relevancia en la función de la proteína (García-Cano et al., 2019).

Según los datos publicados en el portal del proyecto *Genotype-Tissue Expression* (GTEx), el ARN mensajero (ARNm) que codifica HERC1 tiene un patrón de expresión mayoritariamente ubicuo en humanos, aunque algo mayor en el cerebro y los testículos (Sánchez-Tena et al., 2016; Schneider et al., 2017). A nivel subcelular, HERC1 se encuentra exclusivamente en el citoplasma, en forma soluble o en asociación con el aparato de Golgi o membrana vesiculares (García-Gonzalo et al., 2005; Schneider et al., 2017).

En cuanto a su función, la proteína HERC1 está implicada en determinados procesos relacionados con el crecimiento, la plasticidad y la autofagia neuronal. HERC1 tiene capacidad para interactuar con la proteína TSC2 (del inglés, *Tuberous Sclerosis Complex 2*) presente en el complejo TSC1-TSC2 o hamartina-tuberina codificado por genes supresores de tumores que se encuentran mutados en el síndrome tumoral del complejo de esclerosis tuberosa (Sánchez-Tena et al., 2016). Dado que HERC1 actúa como GEF, desfosforila a la proteína G Rheb (del inglés, *Ras Homolog Enriched in Brain*) para disminuir la actividad de mTORC1 (del inglés, *mammalian Target Of Rapamycin Complex 1*). La reducción en la actividad de mTORC1 ocasiona, a su vez, una disminución de la cantidad de S6K1 (del inglés, *Ribosomal Protein S6 Kinase β -1*) fosforilada en detrimento de la función mitótica (Mashimo et al., 2009).

Al mismo tiempo, mTORC1 está regulada por la proteína fosfatidilinositol 3-cinasa (PI3K) y las isoenzimas AKT de la proteína cinasa B (PKB), de forma que el conjunto de las tres proteínas hace posible que se pueda llevar a cabo la vía PI3K/AKT/mTOR (Figura 4) (Bachiller et al., 2018 [B]). En condiciones fisiológicas, cuando los niveles de HERC1 no se encuentran alterados, la vía PI3K/AKT/mTOR queda regulada negativamente por la actividad de esta proteína. Esto tiene como consecuencia la atenuación de la proliferación y desarrollo neuronal (Mashimo et al., 2009).

La sobreexpresión de HERC1 podría estar estabilizando aún más el complejo TSC1-TSC2 y aumentando considerablemente la cantidad de AKT fosforilada, lo que supondría la aparición de un mecanismo de retroalimentación negativa en el que también disminuyen los niveles de PI3K. Dado que PI3K y AKT se encargan de inhibir al complejo TSC1-TSC2, un aumento de los niveles

HERC1 implicaría una mayor expresión de dicho complejo con la consecuente inhibición del resto de la ruta y la disminución de su efecto trófico, así como la aparición de problemas de mielinización, como se comentará posteriormente (Bachiller et al., 2018 [B]).

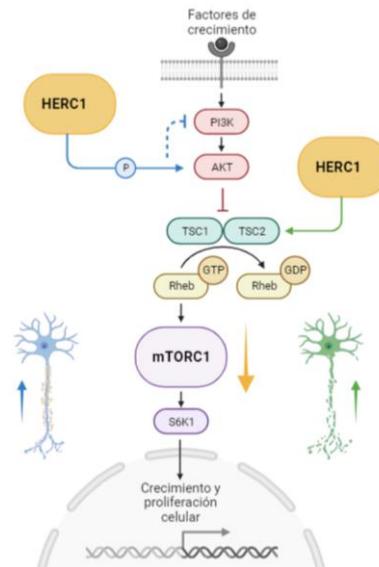


Figura 4. Vía PI3K/AKT/mTOR. [Creada en BioRender.com]

Algunos factores de crecimiento endógenos son capaces de unirse a su receptor específico presente en la membrana plasmática de las células e iniciar la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR que favorece el crecimiento y la proliferación celular. La proteína HERC1 es capaz de estabilizar al complejo TSC1-TSC2 y, como puede actuar como GEF, desfosforila a Rheb disminuyendo la actividad de mTORC1, la cantidad de S6K1 fosforilada y la función mitótica. Por otra parte, el complejo TSC1-TSC2 se encuentra regulado negativamente por la proteína PI3K y las isoenzimas AKT de PKB.

Ratones *tambaleantes*

Los ratones con fenotipo *tambaleante* (*tbl*) aparecieron por primera vez y de forma espontánea en la década de los años 80 en el centro de animales del Instituto Pasteur en París. Los análisis genéticos que se realizaron a estos peculiares animales concluyeron que dicho fenotipo es causado por la mutación autosómica recesiva G1448 que provoca un único cambio de nucleótido. Dicho cambio consiste en la sustitución de un residuo de glicina por uno de ácido glutámico en la posición 483, Gly483Glu, dentro del exón 5 del dominio RLD1 altamente conservado de HERC1 (Mashimo et al., 2009).

Esta mutación da como resultado la sobreexpresión de la proteína *Herc1^{tbl}* en el SNC, lo que implica una mayor estabilidad de TSC2 junto a una mayor inhibición de la vía mTOR y un aumento en la extensión de la autofagia por el tejido neuronal (Chong-Kopera et al., 2006). La función anómala de la vía mTOR podría ser la causa de la desregulación de la autofagia que provoca la muerte de las células de Purkinje en el cerebelo del ratón con fenotipo *tbl* (Bachiller et al., 2018 [B]; Ruiz et al., 2016).

Estudios posteriores muestran que los efectos de esta mutación se extienden a otras poblaciones de neuronas presentes en el SNC más allá del cerebelo, como son las neuronas motoras en la médula espinal o las neuronas piramidales en la región CA3 del hipocampo y la neocorteza (Pérez-Villegas et al., 2018). Sin embargo, un análisis ultraestructural en el que se estudian los signos de autofagia, como los autofagosomas, lisosomas y mitocondrias alteradas, refleja que la cantidad de neuronas afectadas en estas otras regiones no es tan evidente en comparación con el daño que produce la mutación en el cerebelo del ratón *tbl* (Ruiz et al., 2016).

La degeneración de las células de Purkinje comienza a aumentar drásticamente a partir del segundo mes de vida del ratón *tbl* y continúa durante la edad adulta (Bachiller et al., 2015; Mashimo et al., 2009; Pérez-Villegas et al., 2022). Se manifiesta en tal magnitud que, cuando el ratón *tbl* tiene un año de edad, solo conserva el 1% del total de las mismas (Dusart et al., 2006). Como la disminución en la viabilidad de las células de Purkinje se produce una vez que los circuitos cerebelosos se han desarrollado y madurado, los ratones con fenotipo *tbl* se han convertido en un modelo idóneo para investigar el papel que lleva a cabo el cerebelo en distintas tareas relacionadas con el aprendizaje motor (Porrás-García et al., 2013).

El rasgo más característico del fenotipo *tbl* es el síndrome de ataxia que cursa con temblor y marcha inestables, así como con un reflejo de contracción en las extremidades posteriores (Figura 5) en este grupo de ratones que se manifiesta claramente a partir de las ocho semanas de vida en paralelo a la degeneración de las células de Purkinje cerebelosas (Bachiller et al., 2015; Mashimo et al., 2009).



Figura 5. Reflejo de contracción en las extremidades posteriores del ratón *tbl* (Mashimo et al., 2009).

Sin embargo, a partir del primer mes de vida (día postnatal 30, P30), los ratones *tbl* se pueden distinguir de aquellos que no presentan mutación por tener un peso corporal y rendimiento motor inferior, medido en ensayos de fuerza de agarre de extremidades anteriores y coordinación motora en rotarod. Por tanto, parece que los ratones *tbl* presentan un deterioro en el comportamiento motor antes de la pérdida masiva de células de Purkinje en el cerebelo (Bachiller et al., 2015).

Recientemente también se han descrito anomalías a nivel de la UNM a las dos semanas de edad de los ratones *tbl*, que preceden a la neurodegeneración y al síndrome atáxico (Bachiller et al., 2015). Estas alteraciones se reflejan en músculos de contracción rápida como *Levator Auris Longus* (LAL), lenta como *Transversus Abdominis* (TVA) y mixtos como *Gastrocnemius* (GN) (Pérez-Villegas et al., 2022). Consisten en una reducción del área de la placa terminal motora, una liberación irregular de neurotransmisores en el espacio sináptico y una mielinización deficiente en las células de Schwann terminales de las zonas presináptica y postsináptica. Como consecuencia, se produce un aumento en la dificultad para la difusión normal de neurotransmisores en la hendidura sináptica que supone un retraso en la transmisión del impulso nervioso, una actividad neuromuscular menos eficaz y problemas de aprendizaje, memoria y control motor (Bachiller et al., 2018 [B]).

En 2018, se realizó un estudio ultraestructural centrado en el nervio ciático con el objetivo de conocer el posible defecto en el proceso de mielinización neuronal de los ratones *tbl*. En primer lugar, se observó una mielina no compacta a nivel de las incisuras de Schmidt-Lanterman y en los nódulos de Ranvier se percibieron focos de mielina hipertrófica e irregular en forma de invaginaciones que se encontraban comprimiendo el axón. Además, también se vio que los haces de Remak formados por las células de Schwann no mielinizantes (NMSC) envuelven un mayor número de pequeños axones aislados en los nervios periféricos de ratones *tbl*, lo que hizo que el diámetro medio del axón y el número de bolsas poliaxónicas aumentara significativamente. En conclusión, ambos hallazgos sugieren que *Herc1* es necesaria para la correcta mielinización y una sobreexpresión de la proteína mutada conduce a defectos en la conducción del impulso nervioso a través de los axones presentes en los nervios periféricos y a una alteración del control motor (Bachiller et al., 2018 [B]).

Manifestaciones clínicas

La mutación en el gen que codifica la proteína *HERC1* da lugar a una sintomatología clínica evidente y característica de alteraciones relacionadas con el desarrollo neurológico como discapacidad intelectual, demencia, ataques epilépticos, Trastornos del Espectro Autista (TEA), entre otros síntomas. Pese a que los pacientes con mutaciones homocigóticas o heterocigóticas presenten estos signos, la mayoría padecen una enfermedad neurodegenerativa autosómica recesiva denominada MDFPMR (del inglés, *Macrocephaly, Dysmorphic Facies and Psychomotor Retardation*) (Pérez-Villegas et al., 2022). Además de estos síntomas, la neurodegeneración causada en el cerebelo puede desencadenar la aparición de otras patologías como las enfermedades de Alzheimer, Huntington y Parkinson (Pérez-Villegas et al., 2018).

Microglía asociada a enfermedad (DAM)

Cada vez es más evidente que las células gliales, como las células de Schwann o la microglía, son imprescindibles para el correcto funcionamiento neuronal tanto en el SNC como en el SNP, y anomalías en su estructura o función suponen un gran impacto en distintos procesos neurodegenerativos (Bachiller et al., 2018 [B]). En este sentido, la investigación en el campo del envejecimiento neuronal está focalizada principalmente en la identificación de mecanismos intrínsecos del cuerpo capaces de detectar fallos en el sistema nervioso de forma temprana y prevenir potenciales daños para protegerlo de la neurodegeneración (Deczkowska et al., 2018).

La microglía constituye una población de células especializadas en la inmunidad innata que se encargan de defender al SNC y mantener su homeostasis. Históricamente, en ausencia de neuropatologías, la microglía se consideraba un tejido inerte, pero estudios posteriores han demostrado que juega un papel dinámico y fundamental en el mantenimiento de la función cerebral normal (Stowell et al., 2018). Las células microgliales se originan a partir de células hematopoyéticas en el mesoderma del saco embrionario y migran al SNC durante la embriogénesis donde se van renovando a lo largo del tiempo (Butovsky & Weiner, 2018). Una vez allí, se distribuyen heterogéneamente y van dando forma a los circuitos neuronales, modelando la red de sinapsis y fagocitando axones causantes de conexiones erróneas. Además de en la neurogénesis, la microglía interviene en el proceso de oligodendrogénesis, liberando factores tróficos solubles y asegurando que los oligodendrocitos mielinicen correctamente los axones neuronales en el SNC (Hagemeyer et al., 2017).

En condiciones fisiológicas, la estructura, cantidad y actividad de las células microgliales están estrictamente determinadas por el entorno y por su interacción con otras células adyacentes. En estado de reposo o quiescencia se encuentra altamente ramificada y con procesos móviles para estar en contacto con abundantes elementos neuronales (Stowell et al., 2018). Sin embargo, cuando el SNC sufre una perturbación, la microglía tiene la capacidad de originar una potente respuesta inflamatoria modificando su morfología, proliferación, actividad fagocítica y presentación de antígenos, así como mediante el reclutamiento de monocitos y la liberación de diferentes factores inflamatorios (Butovsky & Weiner, 2018).

Los primeros estudios clasificaban a la microglía en dos estados fenotípicos opuestos. El fenotipo M1 presenta un perfil proinflamatorio en el que las células microgliales producen y liberan óxido nítrico (NO), especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (NRS), y citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α , del inglés, *Tumor Necrosis Factor α*), la interleucina 1 β (IL-1 β , del inglés, *interleukin-1 β*) o la interleucina 12 (IL-12, del inglés, *interleukin-12*) para defender al

tejido de cualquier amenaza. Por el contrario, el fenotipo M2 presenta un perfil antiinflamatorio en el que las células microgliales producen y liberan factores neurotróficos como el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β , del inglés, *Transforming Growth Factor β*) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés, *Brain Derived Neurotrophic Factor*) para favorecer la renovación tisular y la angiogénesis (Tang & Le, 2016). Realmente, estudios posteriores demuestran que la activación de la microglía no se basa en los fenotipos “blanco y negro”, sino que responde más bien a una escala de grises en función de las condiciones neurodegenerativas que la rodean y además pueden coexistir (Bachiller et al., 2018 [A]; Deczkowska et al., 2018).

De hecho, se conoce un perfil de microglía activada, denominado fenotipo DAM (del inglés, *Disease-Associated Microglia*), que se expresa en el cerebelo cuando existen condiciones neurodegenerativas y es muy diferente al de la microglía activada cortical (Bachiller et al., 2018 [A]). En esta zona la microglía es menos abundante, pero se renueva a mayor velocidad, lo que aumenta su sensibilidad a las alteraciones homeostáticas. También está menos ramificada y es menos densa, pero se encuentra conectada estrechamente con los somas y las dendritas de las células de Purkinje y presenta una mayor expresión de genes inmunológicos, lo que sugiere que la microglía cerebelosa responde más rápidamente a una lesión tisular focal porque se encuentra en un estado de reposo “más activado” (Stowell et al., 2018).

Estudios realizados en este laboratorio determinan que en los ratones *tbl* la microglía vira a fenotipo DAM antes de que comience la autofagia descontrolada de las células de Purkinje en el cerebelo, por lo que su activación podría estar promoviendo la aceleración del proceso neurodegenerativo en esa zona del SNC (Ruiz et al., 2018).

Galectina-3 (Gal3)

Las galectinas constituyen una familia de proteínas que tienen en común un dominio de reconocimiento de carbohidratos (CRD, del inglés, *Carbohydrate Recognition Domain*) que le permite unirse a β -galactósidos con distinta afinidad. Se dividen en tres subfamilias según su estructura, prototipo, quimera y repetición en tándem. Mientras que las galectinas prototipo y de repetición en tándem presentan uno y dos CRD localizados en una sola cadena polipeptídica, respectivamente, la Galectina-3 (Gal3) (Figura 6), que es la única galectina quimera que se conoce, posee un CRD C-terminal y un CRD N-terminal unidos por repeticiones ricas en glicina y prolina (Boza-Serrano et al., 2014; Yang et al., 2008). La secuencia CRD C-terminal altamente conservada permite la dimerización reversible de dos monómeros de Gal3 en tanto que la secuencia CRD N-terminal hace posible su polimerización de forma irreversible en presencia de carbohidratos que actúan como ligandos (Boza-Serrano et al., 2019).

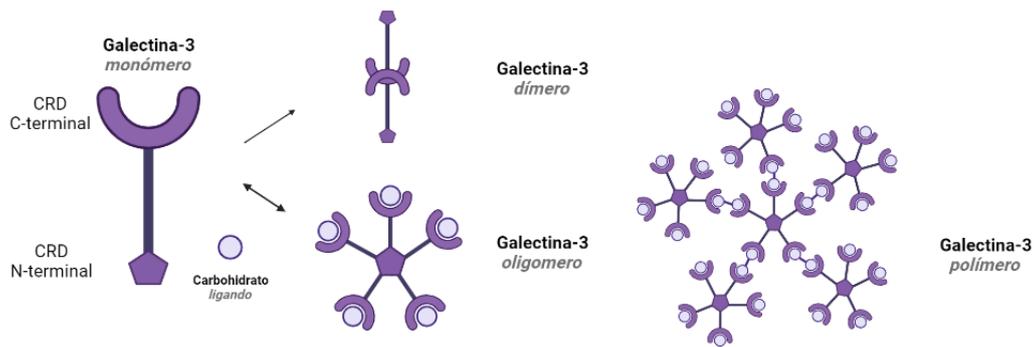


Figura 6. Estructura y organización de Gal3. Basada en (Yang et al., 2008). [Creada en BioRender.com]

Gal3 es una galectina quimera formada por dos dominios de reconocimiento de carbohidratos, uno C-terminal y otro N-terminal, unidos por repeticiones de residuos de glicina y prolina. Es capaz de dimerizarse reversiblemente a través del CRD C-terminal y de polimerizarse irreversiblemente a través del CRD N-terminal utilizando carbohidratos como ligandos (Boza-Serrano et al., 2019).

Gal3 es codificada por el gen *LGALS3* y actúa como un mediador inflamatorio liberado por algunas células activadas, como la microglía, en respuesta a una afección neurodegenerativa como, por ejemplo, el proceso de lesión isquémica. Se encuentra distribuida por el núcleo, citoplasma y las membranas, pero ante ciertos estímulos proinflamatorios puede ser liberado al medio extracelular (Boza-Serrano et al., 2014).

En condiciones de neuroinflamación, la microglía activada libera Gal3 al medio extracelular y ésta actúa como ligando de los receptores TREM2 (del inglés, *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2*) (Boza-Serrano et al., 2019) y TLR4 (del inglés, *Toll-Like Receptor 4*) (Burguillos et al., 2015) presentes en la microglía circundante, provocando así una mayor expresión del fenotipo DAM en el SNC. Por tanto, Gal3 es capaz de actuar como inmunomodulador amplificando la reacción proinflamatoria dependiente de TLR4 y generando una activación microglial completa en una situación de lesión neuronal (Burguillos et al., 2015).

Dado que la proteína Gal3 está muy relacionada con la adquisición del fenotipo DAM por parte de la microglía, en el modelo experimental utilizado para la elaboración de este trabajo se ha planteado como hipótesis que, eliminando el gen *Igals3* para suprimir la expresión de Gal3, se podría obtener un efecto de menor muerte neuronal, un rescate motor en los ratones *tbi* y una detección del proceso neurodegenerativo en el cerebelo.

OBJETIVOS

Este estudio parte de un modelo experimental formado por ratones que presentan la mutación autosómica recesiva Gly483Glu en el gen que codifica la proteína Herc1, lo que provoca una degeneración de las células de Purkinje en el cerebelo y los dota de su fenotipo *tbl* que se manifiesta como un trastorno atáxico. Análisis preliminares realizados en nuestro grupo de investigación ponen de manifiesto que la microglía localizada en el cerebelo de estos ratones vira a fenotipo DAM previamente al comienzo de la muerte de las células de Purkinje, es decir, antes de que se alcancen los dos meses de edad. Además, se conoce que la microglía se activa aún más cuando aumenta la expresión de Gal3, lo que podría estar provocando una mayor muerte neuronal entre las células de Purkinje y un agravamiento del proceso neurodegenerativo.

El presente trabajo persigue como principal objetivo estudiar la repercusión que tiene la microglía al adquirir fenotipo DAM en presencia de Gal3 en el transcurso de la neurodegeneración de las células de Purkinje en el cerebelo de los ratones *tbl*. En este sentido, se ha eliminado el gen *Igals3* de los ratones *tbl* para conseguir ratones con fenotipo *tbl* que no expresen Gal3. Con el fin de alcanzarlo, planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización del ratón *tbl* a través de la cuantificación de las células de Purkinje presente en la corteza cerebelosa.
2. Análisis molecular, morfológico y cuantitativo, de la microglía presente en el ratón *tbl* vinculada a la muerte de las células de Purkinje en el cerebelo.
3. Análisis molecular, morfológico y cuantitativo, de las células de Purkinje y la microglía presente en el ratón *tbl* tras la eliminación de la expresión de la proteína Gal3 por delección del gen *Igals3*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

Los animales de experimentación empleados fueron ratones proporcionados por el Centro de Experimentación Animal Óscar Pintado ubicado en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación III (CITIUS-III) Manuel Losada Villasante, en Sevilla, España. Allí permanecieron en un ambiente a temperatura constante de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, con una humedad relativa del 60%, un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas y con acceso a comida y agua *ad libitum*. A los dos meses de edad fueron trasladados al laboratorio del grupo BIO-113 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular situado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, España, donde fueron sacrificados.

Los ratones con fenotipo *tbl* se obtuvieron mediante cruces reproductivos de parejas de ratones portadores de la mutación que codifica para Herc1. Al nacer, todos los ratones *tbl* presentan el gen *Igals3* y expresan fisiológicamente Gal3 en la microglía activada con fenotipo DAM. Para conseguir la expresión del fenotipo *tbl*/Gal3KO (del inglés, Gal3 *Knock-Out*) se requieren ratones con delección en el gen *Igals3* y en los que se encuentra suprimida la liberación de Gal3 en la microglía DAM. En este sentido, se cruzaron ratones heterocigóticos para Herc1 con ratones homocigotos para Gal3KO. Todos los ratones que forman la descendencia fueron genotipados mediante PCR a través del Centro de Investigación, Tecnología e Innovación II (CITIUS-II) Celestino Mutis, en Sevilla, España, para poder ser organizados.

Para la realización de este estudio, los ratones se clasificaron en tres grupos experimentales en función de su genotipo (Tabla 1). El primero de ellos fue denominado WT (del inglés, *Wild-Type*) y en él se incluían ratones con fondo genético C57BL/6, que eran WT para la mutación en el gen que codifica Herc1^{*tbl*} y para Gal3KO o bien WT para Herc1^{*tbl*} y la expresión de Gal3KO en heterocigosis. El segundo grupo experimental, llamado *tbl*, comprendía ratones que expresaban Herc1^{*tbl*} en homocigosis y eran WT o heterocigóticos para Gal3KO. Por último, el tercer grupo, *tbl*/Gal3KO, lo componían ratones que expresaban tanto Herc1^{*tbl*} como Gal3KO en homocigosis.

Tabla 1. Grupos experimentales según los genotipos del animal para Herc1^{*tbl*} y Gal3KO. El código de colores utilizado en adelante es amarillo para WT, verde para *tbl* y morado para *tbl*/Gal3KO.

Grupo experimental	Herc1 ^{<i>tbl</i>}	Gal3KO
WT	WT	WT
	WT	heterocigosis
<i>tbl</i>	homocigosis	WT
	homocigosis	heterocigosis
<i>tbl</i> /Gal3KO	homocigosis	homocigosis

Del primer grupo experimental, o grupo control, se seleccionaron seis ratones, de los cuales dos eran macho y cuatro eran hembras. Por otra parte, de los dos grupos experimentales restantes, se seleccionaron cinco ratones, del segundo se escogieron al azar tres machos y dos hembras mientras que del tercero se eligieron también aleatoriamente dos machos y tres hembras, haciendo un total de 16 ratones, con el fin de conseguir una distribución homogénea entre sexos y evitar que sea un factor que suponga una gran influencia en los resultados del estudio.

Todos los ensayos se llevaron a cabo de acuerdo con el documento “*Guidelines of the European Union Directive*” (2010/63/EU) y la legislación española vigente RD 53/2013 (BOE 34/11370-421, 2013) sobre el uso de animales de experimentación. Los protocolos fueron aprobados por el Comité Ético de la Universidad de Sevilla.

Obtención y preparación de muestras

Tanto los ratones pertenecientes a los grupos experimentales *tbl* y *tbl/Gal3KO* como sus compañeros de camada isogénicos que se incluyen en el grupo WT se sacrificaron a los dos meses de edad, para asegurar que el fenotipo microglial estuviera completamente alcanzado y que se hubiera producido degeneración en las células de Purkinje de la corteza cerebelosa.

En primer lugar, los ratones se anestesiaron con ketamina *Ketamidol*[®] de *Richter Pharma*[®] (Ref. 580395.1) y medetomidina *Sedin*[®] de *Laboratorios Calier S.A.* (Ref. 572768) por vía intraperitoneal, y se comprobó que el plano anestésico era adecuado mediante la pérdida de la respuesta refleja podal en las extremidades inferiores. Posteriormente, se llevó a cabo el procedimiento de perfusión intracardiaca utilizando 40 ml de suero salino fisiológico preparado a una concentración de NaCl del 0,9% y enfriado con hielo previamente. Pasados unos minutos, los animales se decapitaron para proceder a la extracción del cerebro y cerebelo. Sobre una placa de hielo, se diseccionó y separó el cerebro del cerebelo. Ambas partes del hemisferio izquierdo se congelaron a una temperatura de -80°C para poder ser utilizadas en posteriores pruebas de Biología Molecular y las del hemisferio derecho se fijaron mediante inmersión en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% en solución salina tamponada con fosfato 1x (PBS, del inglés *Phosphate Buffered Saline*) *Q Path*[®] de *VWR Chemicals*[®] (Ref. 11699408) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, el tejido se crioprotegió en una solución de sacarosa de *Labbox*[®] (Ref. SUCR-00A-5K0) al 30% en PBS 1x con azida sódica de *Sigma-Aldrich*[®] (Ref. 26628-22-8) para evitar contaminación externa, y se conservó en cámara fría a 4°C hasta que se hundió en el tubo cónico de 15 ml. Una vez en el fondo, se procedió a su congelación utilizando hielo seco y se almacenó en congelador a -20°C.

Del hemisferio derecho de cada cerebelo se obtuvieron secciones coronales a un grosor de 20 μm y a una temperatura de -20°C , haciendo uso del Criostato *Leica*[®] *CM 1850 UV*. Se colocaron cuatro secciones consecutivas, siguiendo siempre el mismo orden de posición (Figura 7), en portaobjetos previamente gelatinizados. Una vez obtenidas todas las muestras en los portaobjetos, se guardaron en cajas dentro de un arcón a -20°C para su posterior procesado en los respectivos análisis histológicos.

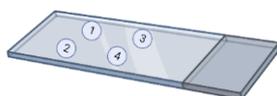


Figura 7. Orden de posición de los cortes histológicos del hemisferio derecho del cerebelo en el portaobjetos.

Para llevar a cabo la gelatinización de los portaobjetos, se calentó agua destilada en una estufa y, cuando alcanzó una temperatura de 52°C , se añadió gelatina tipo A de *Sigma-Aldrich*[®] (Ref. G2500) en pequeñas porciones y en continua agitación. Una vez disuelta, se añadió la misma cantidad de agua destilada calentada previamente y sulfato de cromo potásico dodecahidratado de *Panreac*[®] (Ref. 141284). Cuando la mezcla quedó transparente, se apartó de agitación y se reservó a temperatura ambiente hasta que estuvo templada. Luego, se filtró y se vertió en cubetas para poder introducir las rejillas de tinción con los portaobjetos sin gelatinizar durante 1 minuto. Finalmente, las rejillas de tinción con los portaobjetos ya gelatinizados se secaron en la estufa a 45°C durante 24 horas.

Inmunohistoquímica (IHC)

Para la realización de la técnica de inmunohistoquímica (IHC), se seleccionaron tres portaobjetos por cada ratón a tres alturas del cerebelo distintas. Dado que se sacrificaron 16 ratones, se obtuvieron un total de 48 portaobjetos. El primer portaobjetos fue escogido de la zona posterior del cerebelo, entre los primeros quince portaobjetos obtenidos; el segundo, de la zona media, que corresponde a los portaobjetos que se encontraban entre la decimoquinta y vigésima posición; y el tercero, de la zona anterior, entre los portaobjetos obtenidos más allá de la posición veinteava. De esta forma, se garantiza que las estructuras tisulares escogidas sean equivalentes en todas las muestras.

Se realizaron seis repeticiones de la técnica siguiendo el mismo protocolo, una para cada conjunto de portaobjetos que pertenecían a la misma altura del cerebelo. En las tres primeras IHC se estudió la degeneración de las células de Purkinje en la corteza cerebelosa utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón que se une a la calbindina (Tabla 2). Las otras tres IHC restantes se realizaron con el fin de observar y cuantificar la microglía presente en la corteza y sustancia blanca del cerebelo, para lo que se usó un anticuerpo policlonal de conejo que se une a Iba1 (del

inglés, *Ionized calcium-Binding Adaptor molecule 1*), un marcador que se expresa en la superficie de estas células gliales (Tabla 2).

Los portaobjetos previamente seleccionados se colocaron sobre una placa calefactora de *Axe/Johnson Lab System*[®] a unos 40°C aproximadamente durante 10 minutos. Después, utilizando *ImmEdge*[®] Pen de *Vector Laboratories*[®] (Ref. H-4000), se trazaron circunferencias alrededor de cada corte con el objetivo de crear una capa hidrofóbica para delimitar la zona donde quedan los reactivos sobre el tejido.

Los portaobjetos se colocaron en una cubeta donde se lavaron con PBS 1x (3 x 5 minutos) para el acondicionamiento de los cortes histológicos. A continuación, se incubaron en una disolución de peróxido de hidrógeno al 1% v/v en metanol durante 15 minutos a temperatura ambiente, y se lavaron de nuevo con PBS 1x (3 x 5 minutos). Una vez preparado el tejido, se eliminó el líquido sobrante sobre los portaobjetos y se colocaron sobre una cámara húmeda para proseguir con el protocolo de IHC.

En primer lugar, se bloquearon las uniones inespecíficas del anticuerpo primario incubando las secciones en una solución de albúmina bovina sérica (BSA, del inglés *Bovine Serum Albumin*) de *Sigma-Aldrich*[®] (Ref. A7906) al 5% p/v en PBS-Tritón al 2,5% durante 1 hora a temperatura ambiente. La solución de bloqueo utiliza PBS con Tritón para poder permeabilizar las membranas plasmáticas de las células del tejido y permitir que los anticuerpos depositados posteriormente sobre los cortes puedan penetrar al interior de las mismas y, de esta forma, obtener un buen marcaje para la posterior visualización.

Seguidamente, se añadió el anticuerpo primario (Tabla 2) diluido en una solución de BSA al 2,5% p/v en PBS-Tritón al 2,5% durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, las secciones se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de realizar los lavados con PBS 1x (3 x 5 minutos) en la cubeta. Una vez terminados, los portaobjetos se volvieron a colocar en la cámara húmeda para incubar las secciones con el anticuerpo secundario (Tabla 2) en una solución de BSA al 1% p/v en PBS-Tritón al 2,5% durante 2 horas a temperatura ambiente. Luego, se lavaron de nuevo con PBS 1x (3 x 5 minutos) en la cubeta.

Tabla 2. Anticuerpos utilizados en la técnica de IHC.

Ac primario	Origen	Laboratorio	Dilución	Ac secundario	Origen	Laboratorio	Dilución
Anti-Calbindin	Mouse	<i>Sigma-Aldrich</i> [®] (Ref. ABN2192)	1:1000	Anti-Mouse IgG (H+L) Biotinylated	Goat	<i>Vector Labs.</i> [®] (Ref. BA-9200)	1:200
Anti-Iba1	Rabbit	<i>FUJIFILM Wako</i> [®] (Ref. 019-19741)	1:1000	Anti-Rabbit IgG (H+L) Biotinylated	Goat	<i>Vector Labs.</i> [®] (Ref. BA-1000)	1:200

Posteriormente, se incubaron las muestras con un kit de tinción ABC VECTASTAIN® Elite® de *Vector Laboratories*® (Ref. PX-6100) durante 1 hora. Este kit incluye los reactivos para llevar a cabo la técnica del complejo avidina-biotina, así como la enzima peroxidasa, y de esta forma poder amplificar la intensidad de tinción y mejorar la sensibilidad en la posterior detección de las diferentes estructuras en el tejido. Después, los cortes se lavaron de nuevo con PBS 1x (3 x 5 minutos) en la cubeta.

Tras los lavados, se utilizó otro kit para preparar una solución que incluía 3,3'-diaminobencidina (DAB), enzima peroxidasa y cloruro de níquel de *Vector Laboratories*® (Ref. SK-4100). Se dejó actuar de 2 a 4 minutos sobre las secciones para llevar a cabo una reacción en el que el producto precipitado es de color marrón y así teñir el tejido. Justo a continuación, las muestras se lavaron con PBS 1x (3 x 5 minutos) en la cubeta y los residuos de los reactivos se desecharon en los depósitos destinados a ello en el armario de seguridad del laboratorio.

Finalmente, los cortes se deshidrataron con disoluciones de etanol a concentraciones crecientes, se aclararon con xileno y se montaron con la resina acrílica DPX de *Sigma-Aldrich*® (Ref. 06522) y un cubreobjetos con precaución de no formar burbujas que pudiesen deteriorar el tejido.

Adquisición y análisis de imágenes

- IHC con anticuerpo primario Anti-Calbindin

Una vez completado el protocolo para las tres IHC que utilizan Anti-Calbindin de *Sigma-Aldrich*® (Ref. ABN2192) como anticuerpo primario (Tabla 2), se tomó una imagen completa por cada sección colocada en los portaobjetos haciendo uso de la Lupa *Zeiss*® *AxioZoom V16* a campo claro con el objetivo de 100x, junto al programa informático *ZEN Blue*®, ubicado en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación I (CITIUS-I), en Sevilla, España. Posteriormente, utilizando el programa *offline FijiImageJ Software*®, se procedió al análisis de las mismas.

En primer lugar, para estimar la densidad de células de Purkinje se cuantificó el número de somas presentes en una determinada área de corteza medida en mm². Para ello, de la imagen original (Figura 8A) se seleccionaron tres porciones de corteza aleatorias por cada corte histológico (Figura 8C), obteniéndose 576 en total, y con la herramienta *Cell Counter* se contabilizaron todos los somas visibles en ella (Figura 8D). Se establecieron como criterios que no era necesario que las dendritas estuvieran aparentemente completas, sino que era suficiente con la visualización del núcleo para contar una célula, y que las células no tocaran los bordes de la porción delimitada. Por otra parte, en esas mismas porciones de corteza también se estimó la densidad de células de Purkinje mediante la cuantificación del marcaje de Calbindina utilizando un mismo

umbral o *Threshold* (Figura 8E), lo que se traduce en el área que ocupan las células de Purkinje con respecto a una determinada área de corteza medida en mm². Estos últimos valores se expresaron en forma de porcentaje. Luego, se construyeron gráficas donde se podría conocer la degradación de las células de Purkinje en la corteza cerebelosa de cada grupo experimental.

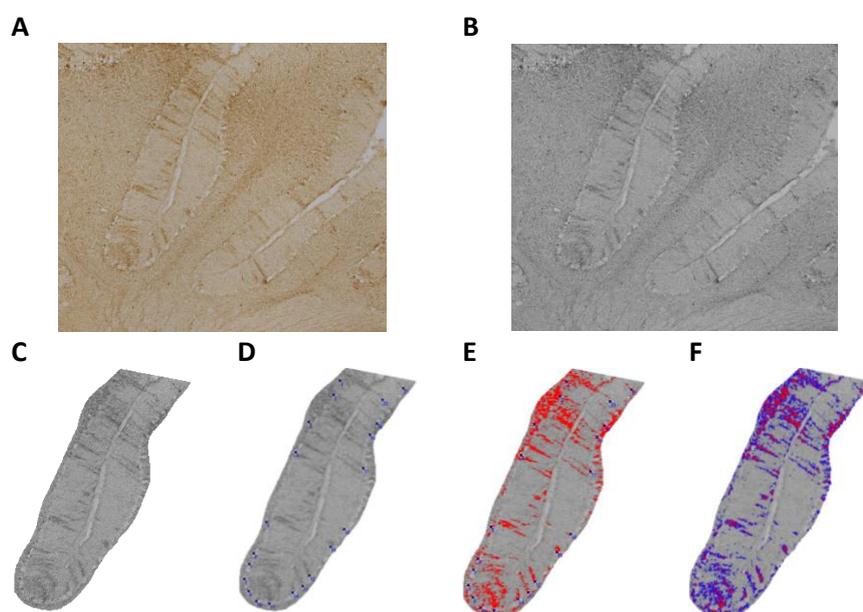


Figura 8. Metodología para llevar a cabo la estimación de la densidad de células de Purkinje en la corteza cerebelosa utilizando el programa *offline FijiImageJ Software*®.

(A) Imagen original. (B) Imagen en escala de grises a 8 bits. (C) Porción de corteza seleccionada. (D) Cuantificación de somas. (E) Aplicación del umbral o *Threshold*. (F) Determinación del área generada.

- IHC con anticuerpo primario Anti-Iba1

Posteriormente a las IHC con anticuerpo primario Anti-Calbindin, se realizaron tres IHC con anticuerpo primario Anti-Iba1 de *FUJIFILM Wako*® (Ref. 019-19741) como anticuerpo primario (Tabla 2). Las secciones se observaron utilizando el Microscopio óptico *Olympus*® *BX61* a campo claro con el objetivo de 20x y el programa informático *cellSens*®, ubicado en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación I (CITIUS-I), en Sevilla, España. Se tomaron tres imágenes de la corteza cerebelosa, obteniéndose 144 en total, para cuantificar la microglía en cada una de ellas utilizando el programa *offline FijiImageJ Software*®. Por otra parte, las mismas secciones presentes en los portaobjetos se observaron utilizando el Microscopio óptico *Leica*® a campo claro con el objetivo de 20x, ubicado en el laboratorio BIO-113 del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular situado en la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla, España. Allí se visualizaron tres campos de sustancia blanca cerebelosa, 144 en total, en los que se cuantificaron los somas de las células microgliales. Se tuvieron en cuenta las células que se encontraban en el interior y aquellas que estaban en contacto con los márgenes superior y derecho de la celda, por tanto, quedaron excluidas aquellas células en los márgenes inferior e

izquierdo de la celda (Figura 9). Posteriormente, multiplicando el número de somas por el factor numérico 5,9, se obtuvo el número de células microgliales por área medida en mm^2 . Así, se construyeron gráficas donde se podría conocer la cantidad de microglía presente en la corteza y la sustancia blanca cerebelosas de cada grupo experimental.



Figura 9. Imagen de la celda del Microscopio óptico *Olympus* a campo claro utilizada para cuantificar las células microgliales presentes en la sustancia blanca cerebelosa.

Se cuantificaron las que se encontraban en el interior y aquellas que estaban en contacto con los márgenes superior y derecho de la celda, por tanto, quedaron excluidas aquellas células en los márgenes inferior e izquierdo de la celda.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos y la posterior confección de las gráficas se ha realizado utilizando el programa *GraphPad Prism Software® versión 8.4.2*.

En primer lugar, se obtuvieron los valores medios con sus correspondientes desviaciones estándar de cada uno de los cuatro parámetros cuantificados para cada ratón y altura del cerebelo, por lo que se determinó una N de 16. Los datos seguían una distribución normal en la mayoría de los casos al ser analizados mediante los tests de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov, por lo que se procedió a utilizar test paramétricos. En todos los casos, el nivel de significación se estableció en $p < 0,05$. A continuación, se llevó a cabo la prueba t-Student con el fin de observar si existen diferencias significativas entre las zonas anterior, media y posterior del cerebelo dentro de un mismo grupo experimental para cada parámetro cuantificado. En aquellos casos donde se observaron diferencias, se aplicó un test más restrictivo, ANOVA de un factor, para comprobar que realmente existe una distribución heterogénea de las células de Purkinje o microgliales a lo largo del eje anteroposterior del cerebelo del ratón. Para conocer si los grupos experimentales son significativamente distintos con respecto a uno de los parámetros, se utilizó el test ANOVA de un factor seguido del test *pos hoc* de Tukey para comparaciones múltiples y los resultados se representaron en diagramas de violín.

Finalmente, se representaron en gráficos de dispersión parejas de datos de dos variables distintas con el fin de obtener rectas de regresión y coeficientes de correlación que informen de qué forma podría influir uno sobre otro. Además, se estudió si existen diferencias significativas entre las pendientes para los distintos grupos experimentales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Distribución de células de Purkinje y microglía en el eje anteroposterior del cerebelo

En primer lugar, se comprobó que la distribución de las células de Purkinje y de la microglía era homogénea a lo largo de todo el eje anteroposterior del cerebelo del ratón. Para ello, se realizó la prueba t-Student y comparando por parejas los datos obtenidos para cada altura del cerebelo, dentro de un mismo grupo experimental y para una variable concreta. Posteriormente, se aplicó el test ANOVA y el test *pos hoc* de Tukey para comparaciones múltiples, más restrictivos, para confirmar que efectivamente, en algunos grupos experimentales existen diferencias significativas entre las diferentes zonas del cerebelo para un parámetro en concreto.

Tanto en la cantidad de células de Purkinje (Figura 10A, E y I) como en el área que ocupan las mismas dentro de la corteza cerebelosa reflejada a través de área que ocupa el marcaje del anticuerpo Anti-Calbindin (Figura 10B, F y J) no se observan diferencias significativas entre las tres zonas del cerebelo para cada uno de los tres grupos experimentales.

De la misma forma, tampoco existen diferencias significativas en la cantidad de microglía presente en la corteza cerebelosa (Figura 10C, G y K) a lo largo del eje anteroposterior en los distintos grupos experimentales. Sin embargo, el análisis estadístico muestra que la cantidad de microglía en la sustancia blanca (Figura 10D, H y L) es significativamente inferior en el tercio posterior del cerebelo de los ratones WT y *tbl*, en comparación con los tercios anterior y medio, es decir, el número de células microgliales decrece a medida que se avanza en el eje anteroposterior en estos dos casos. En los ratones WT y *tbl* se produce la disminución en la microglía de la sustancia blanca en la zona posterior del cerebelo de manera similar, al contrario de los ratones *tbl*/Gal3KO en los que no tiene lugar, sino que se mantiene en unos valores constantes a lo largo de todo el cerebelo. Esto podría estar relacionado con el papel que juega Gal3 en la formación de las vainas de mielina de los axones que conforman la sustancia blanca. Varios autores describen que Gal3 interviene en la maduración y diferenciación de oligodendrocitos responsables del proceso de mielinización ya que promueve la activación de AKT y, por tanto, el transcurso de la vía PI3K/AKT/mTOR para el crecimiento y proliferación celular (Thomas & Pasquini, 2018). En ratones WT y, principalmente en ratones *tbl* que presentan una sobreexpresión de *Herc1^{tbl}*, podría estar prevaleciendo el efecto inhibitorio de esta proteína sobre la ruta frente al de Gal3, disminuyendo el crecimiento y proliferación celular así como dando lugar a una mielina con una menor integridad y compactación. Sería interesante realizar un estudio en el que se incluyeran ratones con la condición WT/Gal3KO para poder observar si este efecto ocurre específicamente al suprimir la expresión de Gal3.

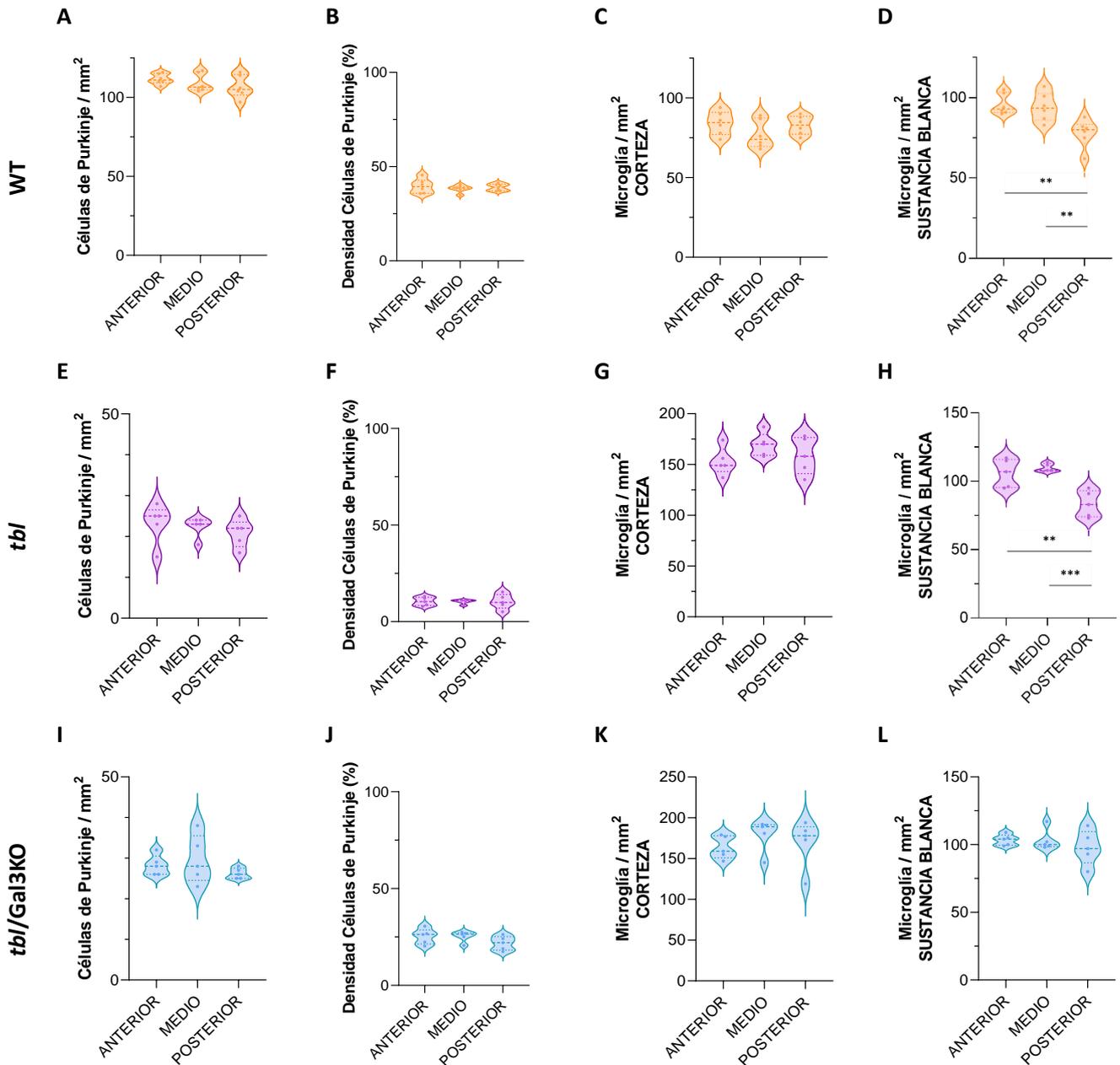


Figura 10. Estudio de la distribución de células de Purkinje y microglía en el eje anteroposterior del cerebelo de ratones de 2 meses.

Número de células de Purkinje en el área medida (mm^2) en el cerebelo de ratones WT (A), *tbl* (E) y *tbl*/Gal3KO (I). Densidad de células de Purkinje (%) en el cerebelo de ratones WT (B), *tbl* (F) y *tbl*/Gal3KO (J). Número de microglía en el área medida (mm^2) en la corteza del cerebelo de ratones WT (C), *tbl* (G) y *tbl*/Gal3KO (K). Número de microglía en el área medida (mm^2) en la sustancia blanca del cerebelo de ratones WT (D), *tbl* (H) y *tbl*/Gal3KO (L). Los resultados se representan en diagramas de violín que reflejan la dispersión de los datos con respecto a la media con una N=16. La significación estadística se calculó con la prueba t-Student y, para los que mostraron diferencias significativas en ella, se calculó con el test ANOVA de un factor seguido del test *pos hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Se establece * en $p < 0,05$, ** en $p < 0,01$, *** en $p < 0,001$ y **** en $p < 0,0001$.

No obstante, a pesar de estas últimas observaciones, los datos reflejan que existe una tendencia generalizada a la distribución homogénea de las células de Purkinje y microgliales a lo largo de todo el cerebelo en la que no influye la condición de cada grupo experimental.

Una vez comprobado que las poblaciones de células de Purkinje y microgliales se encuentran repartidas uniformemente por todo el cerebelo murino en la mayoría de los casos, se procedió a la cuantificación del número de células que pertenecen a cada una con la intención de conocer cómo el fenotipo *tbl*, con y sin expresión de Gal3, influye en el número de células de cada población.

- **Cuantificación de células de Purkinje**

Como se ha descrito anteriormente, cuando existe una sobreexpresión de la proteína Herc1 mutada en el SNC, los procesos de autofagia se desregulan y causan la muerte de las células de Purkinje en el cerebelo del ratón con fenotipo *tbl* (Bachiller et al., 2018 [B]; Ruiz et al., 2016). Se sabe que la población de células de Purkinje está completamente formada alrededor del segundo mes de vida del ratón *tbl* y continúa, aunque en menor medida, durante la edad adulta (Bachiller et al., 2015; Mashimo et al., 2009; Pérez-Villegas et al., 2022). En este sentido, se espera que el número de células de Purkinje sea menor en los ratones con fenotipo *tbl* con respecto a los ratones WT. Con el bloqueo del gen *lgals3* en los ratones *tbl* se pretende conseguir una supresión en la expresión de la proteína Gal3, mediadora en los procesos neuroinflamatorios y, en consecuencia, que en el cerebelo de los ratones *tbl*/Gal3KO haya un aumento en el número de células de Purkinje.

Por lo tanto, para estudiar la magnitud en la que tiene lugar la degeneración de las células de Purkinje en el ratón *tbl* de dos meses de edad y si la delección de Gal3 tiene algún efecto sobre esta población celular, se realizó una IHC utilizando un anticuerpo Anti-Calbindin, considerado como un marcador clásico de las células de Purkinje (Figura 11A).

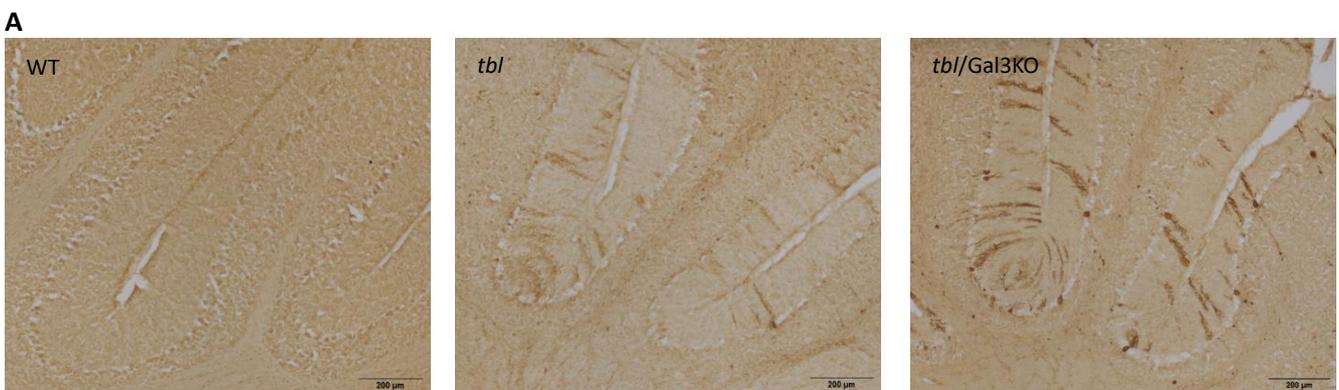
En primer lugar, el análisis estadístico muestra que la cantidad de células de Purkinje presente en el cerebelo de ratones WT ($109,2 \pm 4,2$) es significativamente distinta a la de ratones *tbl* ($22,1 \pm 3,2$) y *tbl*/Gal3KO ($28,0 \pm 2,4$). Concretamente, la población de este tipo celular se ve reducida en un 79,7% en los ratones *tbl* y a un 74,4% en los ratones *tbl*/Gal3KO, lo que supone que el número de células de Purkinje es, aproximadamente, entre cuatro y cinco veces menor en los ratones que presentan una sobreexpresión de Herc1^{*tbl*} en comparación con los ratones que pertenecen al grupo control (Figura 11B).

Además, entre los ratones *tbl* ($22,1 \pm 3,2$) y *tbl*/Gal3KO ($28,0 \pm 2,4$) se puede observar un aumento del 5,3% en el número de células de Purkinje en el cerebelo, lo que podría significar que realmente la delección de Gal3 está jugando un papel importante en la conservación y recuperación neuronal en situaciones de neuroinflamación en ratones con dos meses de edad.

Esta misma tendencia se observa al cuantificar la densidad que ocupan las células de Purkinje en el cerebelo a través del marcaje realizado con el anticuerpo Anti-Calbindin. Los resultados muestran que el área que ocupan las células con respecto al área total del cerebelo de ratones WT ($39,0 \pm 1,2$) es mayor a la de ratones *tbl* ($10,4 \pm 1,9$) y *tbl*/Gal3KO ($24,1 \pm 2,7$). La densidad de las células de Purkinje en el cerebelo decrece en un 73,3% en ratones *tbl* y en un 38,2% en ratones *tbl*/Gal3KO con respecto a los ratones WT considerados como grupo control (Figura 11C). Así, se confirma la hipótesis de que en los ratones con fenotipo *tbl* de dos meses de edad existe una disminución en la población de las células de Purkinje del cerebelo.

Al igual que en el caso anterior, entre los ratones *tbl* ($10,4 \pm 1,9$) y *tbl*/Gal3KO ($24,1 \pm 2,7$) se percibe un aumento del 35,1% en la densidad de células de Purkinje dentro del cerebelo, lo que confirma que la supresión en la expresión de Gal3 supone un rescate parcial en dicha población neuronal presente en el cerebelo. Además, dado que el aumento es mayor en el área que ocupan las células con respecto al número de células, se puede deducir que en los ratones *tbl*/Gal3KO las células de Purkinje presentan una mayor ramificación dendrítica que las de los ratones *tbl*. No obstante, esto será discutido más adelante.

En cuanto al análisis morfológico cualitativo es interesante señalar que, mientras que en el corte histológico del cerebelo de ratones WT las células de Purkinje se disponen de forma adyacente unas a otras sin existir apenas espacio entre ellas, en ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO sí aparecen intercaladas con zonas de corteza libres de células, causado posiblemente por la degeneración de las mismas (Figura 11A). Además, es posible observar de forma cualitativa cómo las células de Purkinje de los ratones *tbl*/Gal3KO presentan unas dendritas más ramificadas que las de los ratones WT y *tbl*. Por este motivo, el área que ocupan con respecto al área total del cerebelo es mayor en ratones que no expresan Gal3.



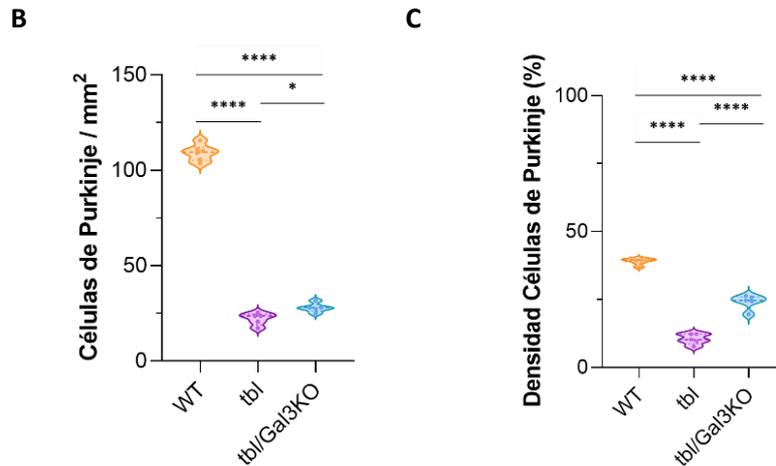


Figura 11. Estudio del marcaje específico de células de Purkinje en el cerebelo de ratones de 2 meses. (A) Imagen de microscopía óptica a campo claro con objetivo 100x de corteza y sustancia blanca en el cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl/Gal3KO*. Las células de Purkinje se han marcado con un anticuerpo Anti-Calbindin. Barra de escala: 200 μ m. (B) Número de células de Purkinje en el área medida (mm^2) en el cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl/Gal3KO*. (C) Densidad de células de Purkinje (%) en el cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl/Gal3KO*. Los resultados se representan en diagramas de violín que reflejan la dispersión de los datos con respecto a la media con una N=16. La significación estadística se calculó con el test ANOVA de un factor seguido del test *pos hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Se establece * en $p < 0,05$, ** en $p < 0,01$, *** en $p < 0,001$ y **** en $p < 0,0001$.

- Variación de la densidad de células de Purkinje (%) con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm^2)

Para conocer de qué forma varía la densidad de células de Purkinje (%) con respecto al número de células de Purkinje por área, se construyó un diagrama de dispersión y se trazaron rectas de regresión en función de los puntos obtenidos por cada grupo experimental (Figura 12). Luego, se obtuvieron las ecuaciones de las rectas con sus respectivos coeficientes de correlación y se analizaron estadísticamente los valores obtenidos para las pendientes.

En primer lugar, se puede afirmar que existe una relación entre las dos variables porque los valores obtenidos para las pendientes son distintos de 0 para los tres grupos experimentales. Dicha relación es positiva, lo que significa que a medida que aumenta el número de células de Purkinje por área, también lo hace la densidad de células de Purkinje (%).

En el diagrama se puede observar que el número de células de Purkinje por área es mayor en ratones WT y algo más elevado en ratones *tbl/Gal3KO* que en ratones *tbl* (Figura 12). Esto quiere decir que, aunque la condición *tbl* supone una degeneración de las células de Purkinje del cerebelo, el bloqueo de la expresión de Gal3 implica una mayor conservación de las mismas y, como consecuencia, un posible rescate motor en los ratones del grupo experimental *tbl/Gal3KO*.

Por otra parte, el diagrama refleja como la pendiente de la recta para los ratones *tbl/Gal3KO* (0,8580; $R^2=0,9858$) es notablemente mayor que para los ratones *tbl* (0,4551; $R^2=0,9145$) y WT (0,3567; $R^2=0,9984$), lo cual se traduce en que, para un mismo número de células de Purkinje

por área, la densidad de células de Purkinje es mayor en ratones *tbl* y aún más en ratones *tbl*/Gal3KO, que en ratones WT (Figura 12). Por ende, se reafirma que las células de Purkinje del cerebelo de los ratones *tbl*/Gal3KO exhiben una mayor arborización que las de los ratones *tbl* y WT. El hecho de que las células de Purkinje sean hipertróficas en ratones que presentan el fenotipo *tbl* se confirma con el análisis morfológico abordado anteriormente en el que se reflejaba como este tipo de células presentaban un árbol dendrítico mucho más ramificado.

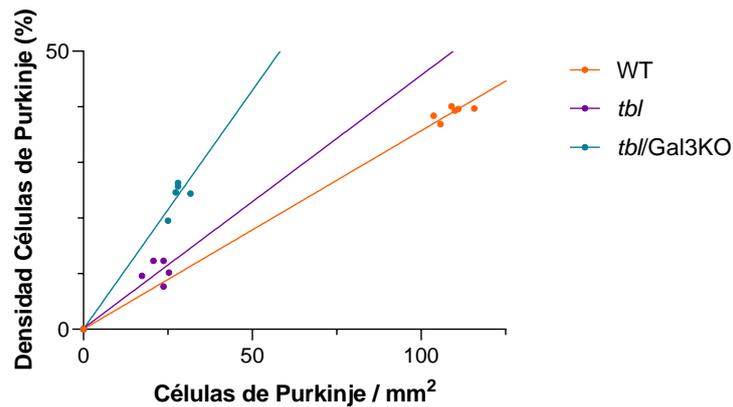


Figura 12. Variación de la densidad de células de Purkinje (%) con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm²) en el cerebelo de ratones de 2 meses pertenecientes a los grupos experimentales WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO. Para ratones WT la pendiente es 0,3567 y R²=0,9984, para ratones *tbl* la pendiente es 0,4551 y R²=0,9145 y para ratones *tbl*/Gal3KO la pendiente es 0,8580 y R²=0,9858. Las tres pendientes son significativamente diferentes de cero (p<0,0001, ***). La significación estadística se calculó con un test que determina si las pendientes y las intersecciones entre rectas son significativamente distintas. Se establece * en p<0,05, ** en p<0,01, *** en p<0,001 y **** en p<0,0001.

- **Cuantificación de microglía**

Las células microgliales forman parte del sistema inmunitario innato del SNC y se encargan de su homeostasis mediante diferentes procesos, como la neurogénesis y la oligodendrogénesis (Stowell et al., 2018). Estas células no son inertes, sino que, al estar estrechamente relacionadas con las células de Purkinje, son capaces de reaccionar ante una amenaza de lesión neuronal. En esta situación, la microglía pasa de un estado de reposo o quiescencia en el que está notablemente ramificada, a un estado activado en el que adquiere una forma más redondeada, originando una intensa respuesta inflamatoria (Butovsky & Weiner, 2018). Dicha reacción provoca que la microglía adquiera fenotipo DAM y aumente la expresión de Gal3 que actúa como mediador inflamatorio, y como consecuencia, se acelere el proceso neurodegenerativo (Boza-Serrano et al., 2019; Burguillos et al., 2015).

Con la intención estudiar la población de células microgliales en el ratón *tbl* de dos meses de edad y si la delección de Gal3 tiene algún efecto sobre la misma, se realizó una IHC usando como marcador un anticuerpo Anti-Iba1 capaz de unirse a la superficie microglial (Figura 13A y C).

- Corteza cerebelosa

En primer lugar, el análisis estadístico muestra que existen diferencias significativas en cuanto a la cantidad de microglía presente en la corteza cerebelosa de ratones WT ($81,3 \pm 4,6$) en comparación con la de ratones *tbl* ($160,3 \pm 9,3$) y *tbl*/Gal3KO ($170,9 \pm 18,5$), siendo estas dos últimas aproximadamente el doble de la del grupo control (Figura 13B). El número de células microgliales en la corteza es un 97,1% superior en los ratones *tbl* y un 101,1% en los ratones *tbl*/Gal3KO (Figura 13B) que en los ratones WT. Esto quiere decir que, en condiciones donde existe un episodio neuroinflamatorio, como ocurre en los fenotipos *tbl* y *tbl*/Gal3KO, la microglía es más abundante y, posiblemente esté más activada a fenotipo DAM, en la corteza cerebelosa de los ratones de dos meses de edad (Ruiz et al., 2018).

También, entre los ratones *tbl* ($160,3 \pm 9,3$) y *tbl*/Gal3KO ($170,9 \pm 18,5$) existe un aumento del 13% en el número de células microgliales en la corteza cerebelosa (Figura 13B), lo cual no supone realmente una diferencia significativa entre los dos grupos experimentales. Por ende, se puede deducir que, aunque la presencia de microglía es más notable en situaciones patológicas como la que se manifiesta en los fenotipos *tbl* y *tbl*/Gal3KO, la no expresión de Gal3 en la corteza del cerebelo en los ratones con dos meses de edad parece que no supone ninguna ventaja con respecto a la contención del proceso neuroinflamatorio desde el punto de vista de la proliferación microglial.

Para confirmar si el fenotipo microglial proinflamatorio se manifiesta o no en ausencia de la expresión de Gal3 en el modelo *tbl*, sería esencial hacer estudios de marcadores específicos de neuroinflamación, como CLEC7A o Dectin-1, mediante técnicas de estudio de la expresión génica. Estudios preliminares en este grupo de investigación con ratones 5xFAD de Alzheimer en los que se suprimió la expresión de Gal3, avalan la atenuación de la respuesta proinflamatoria por parte de la microglía en esta condición, especialmente en aquellas vías de señalización en las que se encuentran implicados TLR y TREM2/DAP12. En consecuencia, se detuvo la progresión de la enfermedad y mejoró el comportamiento cognitivo en ellos (Boza-Serrano et al., 2019). Por tanto, del mismo modo que en el modelo murino de Alzheimer 5xFAD, nuestro modelo atáxico sin expresión de Gal3 presenta una disminución en la pérdida de células de Purkinje y, además, mantiene una arborización más pronunciada, acercándose a los niveles del control, lo que podría retrasar el fenotipo de descoordinación motora característico del mismo. Esto podría significar que los niveles de neuroinflamación generados por parte de la microglía sean menores en ausencia de expresión de Gal3. Futuras aproximaciones experimentales nos permitirán profundizar en este hecho.

- Sustancia blanca cerebelosa

Por otro lado, se realizó el mismo procedimiento para analizar la cantidad de células microgliales presentes en la sustancia blanca cerebelosa. Los resultados reflejan que la población microglial en la sustancia blanca cerebelosa de los ratones WT ($89,3 \pm 3,9$) es significativamente menor a la de ratones *tbl* ($99,7 \pm 5,0$) y *tbl*/Gal3KO ($101,5 \pm 5,2$), al igual que ocurre en la corteza cerebelosa. Sin embargo, en este caso, el número de células microgliales es solo un 11,7% superior en los ratones *tbl* y un 13,7% en los ratones *tbl*/Gal3KO con respecto a los ratones WT, tampoco existiendo diferencias significativas entre los grupos experimentales (Figura 13D).

Este aumento significativo, aunque en menor medida que en la corteza cerebelosa, en el número de células microgliales en la sustancia blanca del cerebelo de los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO con respecto a los WT podría estar relacionado con defectos en el proceso de mielinización a causa de la sobreexpresión de la proteína Herc1^{*tbl*}. Como se ha comentado anteriormente, el correcto funcionamiento de dicha proteína es necesario para una mielinización axonal adecuada. Sin embargo, cuando se encuentra mutada, estabiliza a AKT fosforilada y provoca fallos en la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR que desencadenan defectos en la mielinización y, en consecuencia, en la conducción del impulso nervioso (Bachiller et al., 2018 [B]). Por otra parte, algunos autores sugieren que el receptor TREM2 y la microglía DAM están implicados en la mediación de la respuesta inmunitaria necesaria para metabolizar los restos de mielina (Safaiyan et al., 2021). Sin embargo, al no observar diferencias entre los grupos *tbl* y *tbl*/Gal3KO, es posible que este mecanismo no se encuentre implicado en nuestro modelo murino en el que se bloquea *Igals3*, ya que la ausencia de expresión de Gal3 parece no afectar al número de microglía en la sustancia blanca. En estudios posteriores donde se midan los niveles de marcadores específicos comentados anteriormente permitirán profundizar en el papel de Gal3 en la mielinización.

En resumen de lo observado con respecto a la microglía, podemos concluir que hay indicios claros de que la microglía que se encuentra en la corteza estrechamente asociada a las células de Purkinje adquiere un fenotipo DAM más reactivo inmunológicamente que en condiciones de degeneración mielínica en los axones neuronales presentes en la sustancia blanca.

Del mismo modo, tal como avanzamos anteriormente, entre los ratones *tbl* ($99,7 \pm 5,0$) y *tbl*/Gal3KO ($101,5 \pm 5,2$) la cantidad de microglía presente en la sustancia blanca cerebelosa aumenta en un 2% únicamente con respecto al control (Figura 13D). Dado que, de nuevo, no existe una diferencia significativa entre los dos grupos experimentales, se reafirma que la supresión de la expresión de Gal3 no conlleva un cambio en la proliferación microglial que podría estar asociado a procesos neuroinflamatorios en los ratones con dos meses de edad.

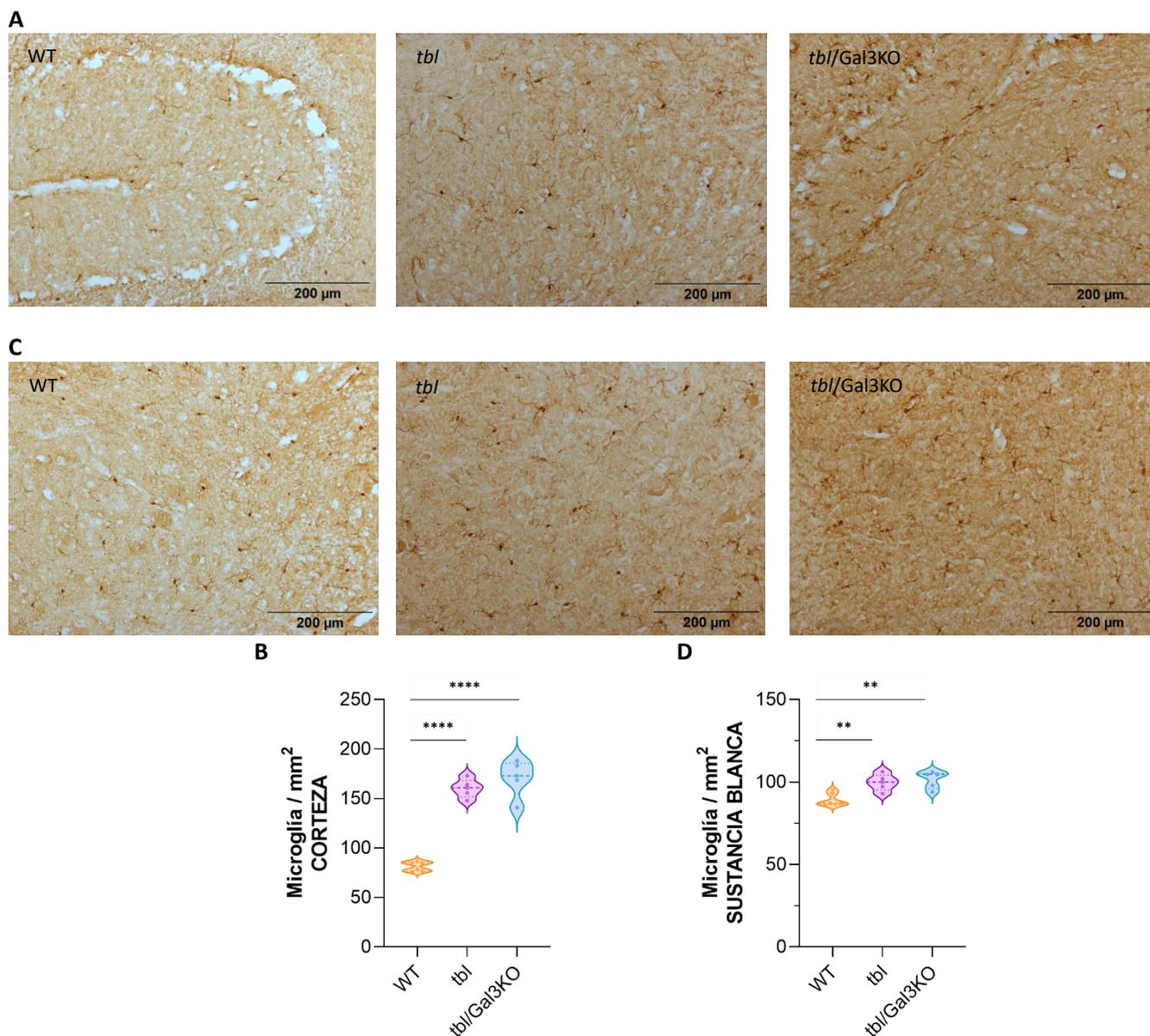


Figura 13. Estudio del marcaje específico de microglía en el cerebelo de ratones de 2 meses.

(A) Imagen de microscopía óptica a campo claro con objetivo 20x de corteza en el cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO. La microglía se ha marcado con un anticuerpo Anti-Iba1. Barra de escala: 200 μ m. (B) Número de microglía en el área medida (mm²) en la corteza del cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO. (C) Imagen de microscopía óptica a campo claro con objetivo 20x de sustancia blanca en el cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO. La microglía se ha marcado con un anticuerpo Anti-Iba1. Barra de escala: 200 μ m. (D) Número de microglía en el área medida (mm²) en la sustancia blanca del cerebelo de ratones WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO. Los resultados se representan en diagramas de violín que reflejan la dispersión de los datos con respecto a la media con una N=16. La significación estadística se calculó con el test ANOVA de un factor seguido del test *post hoc* de Tukey para comparaciones múltiples. Se establece * en $p < 0,05$, ** en $p < 0,01$, *** en $p < 0,001$ y **** en $p < 0,0001$.

- Variación de la cantidad de microglía en corteza con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm^2) y a la densidad de células de Purkinje (%)

Se han representado en dos diagramas de dispersión las parejas de datos y sus correspondientes rectas de regresión con el objeto de conocer de qué forma varía la cantidad de microglía en la corteza con respecto al número de células de Purkinje por área (Figura 14A) y a la densidad que ocupan en cada grupo experimental (Figura 14B). A partir de los mismos, se calcularon las pendientes de las rectas y los coeficientes de correlación, y se analizaron estadísticamente.

Ambos diagramas reflejan cómo el número de células de Purkinje por área y la densidad que ocupan en la sustancia blanca del cerebelo es mayor en ratones WT que en ratones *tbl*/Gal3KO y *tbl* (Figura 14). Esto significa que, de nuevo, aunque en el cerebelo de los ratones *tbl* existe una disminución en el número de células de Purkinje, la supresión de la expresión de Gal3 implica un rescate en la población de dichas células en los ratones del grupo experimental *tbl*/Gal3KO.

Según el análisis estadístico, el valor para la pendiente de la recta para los ratones *tbl* (7,0270; $R^2=0,9672$ (A) 14,8100; $R^2=0,9728$ (B)) y *tbl*/Gal3KO (6,5550; $R^2=0,9908$ (A) 6,9230; $R^2=0,9547$ (B)) es significativamente mayor que en los ratones WT (0,7417; $R^2=0,9881$ (A) 2,0800; $R^2=0,9003$ (B)). Por tanto, para un mismo número de células de Purkinje por área o densidad de las mismas en el cerebelo, existe una mayor cantidad de microglía en la corteza los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO que en ratones WT, lo que quiere decir que la respuesta microglial está más presente en condiciones patológicas que en el grupo control, probablemente por la degeneración de las células de Purkinje en ellas.

Aunque la pendiente de la recta para los ratones *tbl* es mayor que para los ratones *tbl*/Gal3KO en ambos casos, en el diagrama donde se representa la densidad de células de Purkinje en el eje de abscisas (Figura 14B), la diferencia entre las pendientes para los grupos *tbl* y *tbl*/Gal3KO es más notable que en el que se representa la cantidad de células de Purkinje por área (Figura 14A). Esto significa que podría existir una menor activación de las células de la microglía al haber un rescate de la población de las células de Purkinje en los ratones *tbl*/Gal3KO. No obstante, teniendo en cuenta los resultados descritos anteriormente, esta variación entre las pendientes podría deberse al aumento de la ramificación de las células de Purkinje en los ratones *tbl*/Gal3KO, que hace que la densidad de las mismas en la corteza cerebelosa sea mayor y, por tanto, la proporción con respecto a la cantidad de microglía presente en esta zona disminuya.

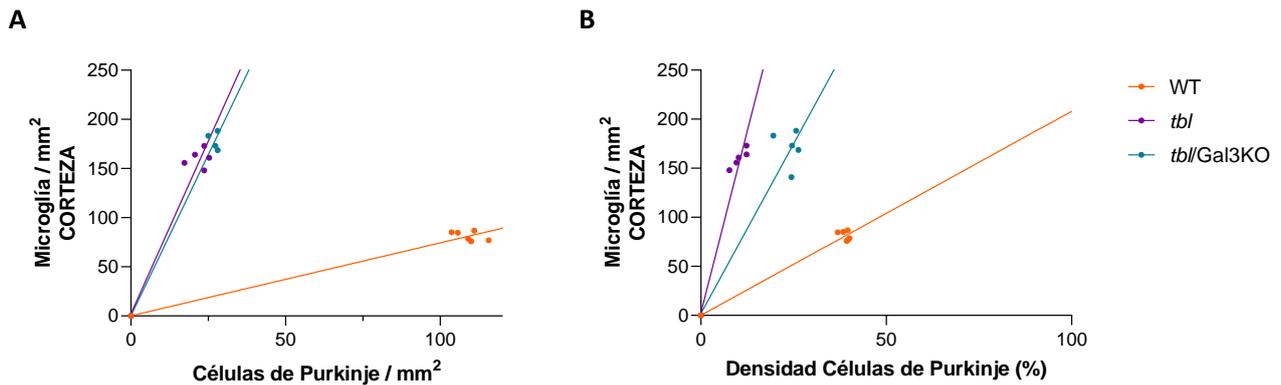


Figura 14. Variación de la cantidad de microglía en corteza con respecto las células de Purkinje en el cerebelo de ratones de 2 meses pertenecientes a los grupos experimentales WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO.

(A) Variación de la cantidad de microglía en corteza con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm²). Para ratones WT la pendiente es 0,7417 y R²=0,9881, para ratones *tbl* la pendiente es 7,0270 y R²=0,9672 y para ratones *tbl*/Gal3KO la pendiente es 6,5500 y R²=0,9908. Las tres pendientes son significativamente diferentes de cero (p<0,0001, ***). (B) Variación de la cantidad de microglía en corteza con respecto a la densidad de células de Purkinje (%). Para ratones WT la pendiente es 2,0800 y R²=0,9903, para ratones *tbl* la pendiente es 14,8100 y R²=0,9728 y para ratones *tbl*/Gal3KO la pendiente es 6,9230 y R²=0,9547. Las tres pendientes son significativamente diferentes de cero (p<0,0001, ***). La significación estadística se calculó con un test que determina si las pendientes y las intersecciones entre rectas son significativamente distintas. Se establece * en p<0,05, ** en p<0,01, *** en p<0,001 y **** en p<0,0001.

- Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm²) y a la densidad de células de Purkinje (%)

Al igual que en el caso anterior, se han construido dos diagramas de dispersión con los datos de las dos variables y se han dibujado las rectas de regresión con el fin de saber cómo influye la variación en el número de células de Purkinje por área (Figura 15A) y la densidad que ocupan (Figura 15B) en la cantidad de microglía presente en la sustancia blanca por cada grupo experimental. A partir de ellos, se obtuvieron las pendientes de las rectas y sus coeficientes de correlación, y después se analizaron estadísticamente.

En ambos casos se puede ver como el número de células de Purkinje por área y la densidad que ocupan en la sustancia blanca del cerebelo es mayor en ratones WT que en ratones *tbl*/Gal3KO y *tbl* (Figura 15). Esto confirma que existe un rescate en la población de las células de Purkinje cuando se suprime la expresión de Gal3 en los ratones *tbl*/Gal3KO.

Una vez realizado el análisis estadístico, el valor para la pendiente de la recta para los ratones *tbl* (4,3450; R²=0,9575 (A) 9,1670; R²=0,9650 (B)) y *tbl*/Gal3KO (3,562; R²=0,9734 (A) 4,1200; R²=0,9723 (B)) es significativamente mayor que en los ratones WT (0,8161; R²=0,9958 (A) 2,2870; R²=0,9970 (B)). Por ende, para un mismo número de células de Purkinje por área o densidad ocupada por éstas en el cerebelo, hay más células microgliales en la sustancia blanca cerebelosa de los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO que en ratones WT, lo cual significa que la microglía es más

abundante en los grupos experimentales que incluyen fenotipo *tbl* donde hay una disminución en la población de células de Purkinje y una respuesta neuroinflamatoria asociada a ella.

Igualmente, la pendiente de la recta es más pronunciada para los ratones *tbl* que para los ratones *tbl*/Gal3KO en ambos casos. No obstante, en el diagrama donde se representa la densidad de células de Purkinje en el eje de abscisas (Figura 15B), la diferencia entre las pendientes para los grupos *tbl* y *tbl*/Gal3KO es más notable que en el que se representa la cantidad de células de Purkinje por área (Figura 15A). Al igual que en la corteza cerebelosa, parece que la activación microglial es menor en los ratones *tbl*/Gal3KO que en los *tbl* a causa del rescate de la población de las células de Purkinje, aunque se debe tener en cuenta lo indicado anteriormente.

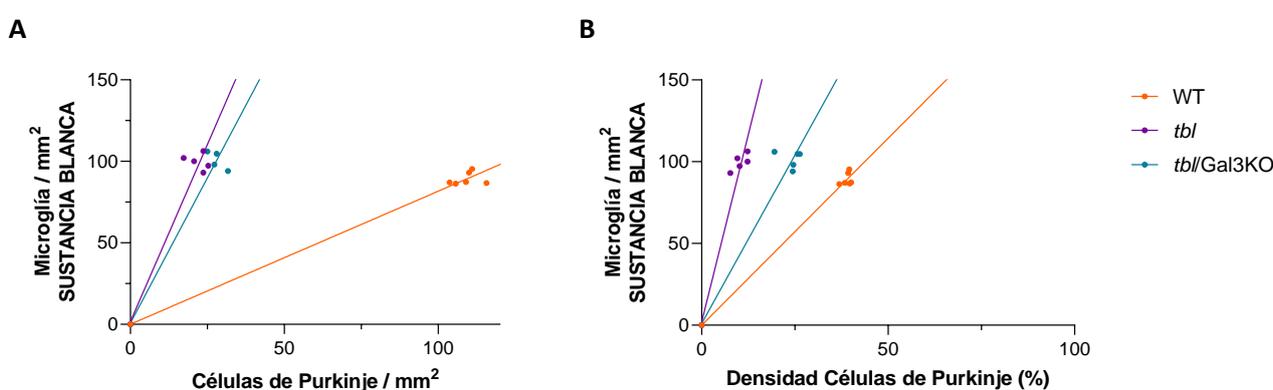


Figura 15. Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto las células de Purkinje en el cerebelo de ratones de 2 meses pertenecientes a los grupos experimentales WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO.

(A) Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto al número de células de Purkinje en el área medida (mm²). Para ratones WT la pendiente es 0,8161 y R²=0,9958, para ratones *tbl* la pendiente es 4,3450 y R²=0,9575 y para ratones *tbl*/Gal3KO la pendiente es 3,5620 y R²=0,9734. Las tres pendientes son significativamente diferentes de cero (p<0,0001, ****). (B) Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto a la densidad de células de Purkinje (%). Para ratones WT la pendiente es 2,2870 y R²=0,9970, para ratones *tbl* la pendiente es 9,1670 y R²=0,9650 y para ratones *tbl*/Gal3KO la pendiente es 4,1200 y R²=0,9723. Las tres pendientes son significativamente diferentes de cero (p<0,0001, ****). La significación estadística se calculó con un test que determina si las pendientes y las intersecciones entre rectas son significativamente distintas. Se establece * en p<0,05, ** en p<0,01, *** en p<0,001 y **** en p<0,0001.

- Variación de la cantidad de microglía en sustancia blanca con respecto a la cantidad de microglía en corteza por área medida (mm²)

Por último, se ha construido un diagrama en el que se representa cómo varía la cantidad de microglía presente en la sustancia blanca con respecto a la existente en la corteza cerebelosa (Figura 16). Para ello, de nuevo se han representado las parejas de datos como puntos y se han dibujado las rectas de regresión, las cuales llevan asociadas una pendiente y un coeficiente de correlación, parámetros que se utilizarán posteriormente para el análisis estadístico.

Para los tres grupos experimentales se cumple que el aumento en la cantidad de microglía localizada en la corteza cerebelosa es directamente proporcional a la cantidad de microglía en la

sustancia blanca, por tanto, a medida que aumenta el número de células microgliales en la corteza, también aumenta en la sustancia blanca cerebelosa.

En este caso, al contrario que en los anteriores, el valor para la pendiente de la recta en los ratones WT (1,0920; $R^2=0,9925$) es significativamente superior al de los ratones *tbl* (0,6210; $R^2=0,9983$) y *tbl*/Gal3KO (0,5874; $R^2=0,9921$). Esto significa que, en ratones WT, por cada célula microglial presente en la corteza hay una en la sustancia blanca, mientras que en ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO, hay una célula microglial en la sustancia blanca por cada dos presentes en la corteza cerebelosa. Por tanto, se puede concluir que, en ratones con condiciones fenotípicas *tbl* y *tbl*/Gal3KO, la cantidad de células microgliales en la corteza es mayor que en la sustancia blanca.

Esto podría deberse a que, como se ha observado que la degeneración de las células de Purkinje en los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO se produce mayoritariamente en la corteza cerebelosa, existe una mayor proliferación microglial en las capas más superficiales del cerebelo antes de que se produzca en las capas más profundas, como la sustancia blanca.

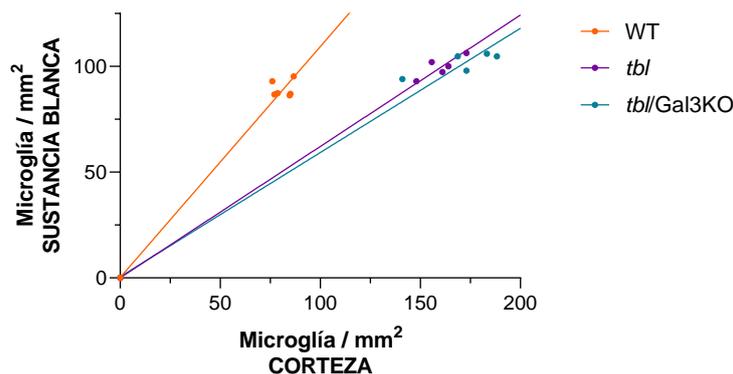


Figura 16. Variación de la cantidad de microglía en la sustancia blanca con respecto a la cantidad de microglía en corteza en el área medida (mm^2) en el cerebelo de ratones de 2 meses pertenecientes a los grupos experimentales WT, *tbl* y *tbl*/Gal3KO.

Para ratones WT la pendiente es 1,0920 y $R^2=0,9925$, para ratones *tbl* la pendiente es 0,6210 y $R^2=0,9983$ y para ratones *tbl*/Gal3KO la pendiente es 0,5874 y $R^2=0,9921$. Las tres pendientes son significativamente diferentes de cero ($p<0,0001$, ***). La significación estadística se calculó con un test que determina si las pendientes y las intersecciones entre rectas son significativamente distintas. Se establece * en $p<0,05$, ** en $p<0,01$, *** en $p<0,001$ y **** en $p<0,0001$.

CONCLUSIONES

Una vez expuestos y discutidos los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que:

- La distribución de las células de Purkinje y de la microglía es homogénea a lo largo del eje anteroposterior del cerebelo del ratón, por lo que no existen diferencias significativas en la cantidad de estas células entre las zonas anterior, media y posterior del mismo.
- La población de células de Purkinje en el cerebelo de los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO es menos abundante que la de ratones WT a causa de la degeneración de las mismas por la sobreexpresión de la proteína mutada Herc1^{*tbl*} en el cerebelo de los ratones con dos meses de edad.
- Al bloquear el gen *Igals3* y suprimir la expresión del mediador neuroinflamatorio Gal3 en los ratones con fenotipo *tbl*, se observa cómo la muerte autofágica de las células de Purkinje disminuye y, por tanto, existe un posible rescate motor en ellos.
- La microglía es más abundante en los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO en respuesta al proceso neuroinflamatorio, no obstante, no existen diferencias en esta población celular entre los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO, por lo que la supresión de Gal3 no supone ninguna ventaja con respecto a la detención del aumento de la población microglial en el cerebelo.
- Dado que la población de células microgliales es mayor en la corteza que en la sustancia blanca cerebelosas, la degeneración de las células de Purkinje predominante en la corteza cerebelosa de los ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO podría estar causando una mayor activación y reactividad de la microglía ante estas condiciones neuroinflamatorias en las capas más superficiales del cerebelo antes que en las profundas.
- El aumento en la cantidad de microglía en la sustancia blanca del cerebelo de ratones *tbl* y *tbl*/Gal3KO en comparación con los WT puede deberse a problemas en la mielinización axonal, no obstante, no es tan notable como en la corteza cerebelosa.
- En cuanto al análisis morfológico, parece que las células de Purkinje de los ratones *tbl*/Gal3KO presentan un árbol dendrítico más ramificado que las de los otros dos grupos experimentales. Esto podría deberse a un mayor control del proceso neuroinflamatorio que tiene lugar en la corteza cerebelosa principalmente por la degeneración de las células de Purkinje en los ratones *tbl*.

ABREVIATURAS

ARNm: ARN mensajero	PFA: paraformaldehído
BDNF: <i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>	PI3K: fosfatidilinositol 3-cinasa
BH3: <i>Bcl-2 Homology Domain 3</i>	PKB: proteína cinasa B
BSA: <i>Bovine Serum Albumin</i>	RLD: <i>Regulator of Chromosome Condensation 1 (RCC1) Like Domain</i>
CITIUS: Centro de Investigación, Tecnología e Innovación de la Universidad de Sevilla	ROS: especies reactivas de oxígeno
CRD: <i>Carbohydrate Recognition Domain</i>	S6K1: <i>Ribosomal Protein S6 Kinase β-1</i>
DAB: 3,3'-diaminobencidina	SNC: Sistema Nervioso Central
DAM: <i>Disease-Associated Microglia</i>	SNP: Sistema Nervioso Periférico
E1: enzimas activadoras de ubiquitina	SRPY: <i>spl A and RyR</i>
E2: enzimas conjugadoras de ubiquitina	<i>tbl:</i> <i>tambaleante</i>
E3: enzimas ligasas de ubiquitina	TEA: Trastornos del Espectro Autista
Gal3: Galectina-3	TGF-β: <i>Transforming Growth Factor β</i>
GEF: <i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>	TLR4: <i>Toll-Like Receptor 4</i>
GN: <i>Gastrocnemius</i>	TNF-α: <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
GTE_x: <i>Genotype-Tissue Expression</i>	TREM2: <i>Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2</i>
HECT: <i>Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus</i>	TSC1: <i>Tuberous Sclerosis Complex 1</i>
Hs: <i>Homo sapiens</i>	TSC2: <i>Tuberous Sclerosis Complex 2</i>
Iba1: <i>Ionized calcium-Binding Adaptor molecule 1</i>	TVA: <i>Transversus Abdominis</i>
IHC: inmunohistoquímica	Ub: ubiquitina
IL-12: <i>interleukin-12</i>	UNM: unión neuromuscular
IL-1β: <i>interleukin-1β</i>	UPS: Sistema Ubiquitina-Proteasoma
KO: <i>Knock-Out</i>	WT: <i>Wild-Type</i>
LAL: <i>Levator Auris Longus</i>	
MDFPMR: <i>Macrocephaly, Dysmorphic Facies and Psychomotor Retardation</i>	
Mm: <i>Mus musculus</i>	
MN: motoneurona	
mTORC1: <i>mammalian Target Of Rapamycin Complex 1</i>	
NMSC: células de Schwann no mielinizantes	
NO: óxido nítrico	
NRS: especies reactivas de nitrógeno	
PBS: <i>Phosphate Buffered Saline</i>	

BIBLIOGRAFÍA

- Bachiller S, Alonso-Bellido IM, Real LM, Pérez-Villegas EM, Venero JL, Deierborg T et al. The Ubiquitin Proteasome System in Neuromuscular Disorders: Moving Beyond Movement. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(17): 1-20. <https://doi.org/10.3390/ijms21176429>
- Bachiller S, Jiménez-Ferrer I, Paulus A, Yang Y, Swanberg M, Deierborg T et al. Microglia in neurological diseases: A road map to brain-disease dependent-inflammatory response. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12(288): 1-17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488>
- Bachiller S, Roca-Ceballos MA, García-Domínguez I, Pérez-Villegas EM, Martos-Carmona D, Pérez-Castro MA et al. HERC1 Ubiquitin Ligase Is Required for Normal Axonal Myelination in the Peripheral Nervous System. *Mol Neurobiol.* 2018; 55(12): 8856-8868. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1021-0>
- Bachiller S, Rybkina T, Porrás-García E, Pérez-Villegas E, Tabares L, Armengol JA et al. The HERC1 E3 Ubiquitin Ligase is essential for normal development and for neurotransmission at the mouse neuromuscular junction. *Cell Mol Life Sci.* 2015; 72(15): 2961-2971. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1878-2>
- Boza-Serrano A, Reyes JF, Rey NL, Leffler H, Bousset L, Nilsson U et al. The role of Galectin-3 in α -synuclein-induced microglial activation. *ANC.* 2014; 2(1): 1-14. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0156-0>
- Boza-Serrano A, Ruiz R, Sánchez-Varo R, García-Revilla J, Yang Y, Jiménez-Ferrer I et al. Galectin-3, a novel endogenous TREM2 ligand, detrimentally regulates inflammatory response in Alzheimer's disease. *ANC.* 2019; 138(2): 251-273. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02013-z>
- Burguillos MA, Svensson M, Schulte T, Boza-Serrano A, García-Quintanilla A, Kavanagh E et al. Microglia-Secreted Galectin-3 Acts as a Toll-like Receptor 4 Ligand and Contributes to Microglial Activation. *Cell Rep.* 2015; 10(9): 1626-1638. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.02.012>
- Butovsky O, Weiner HL. Microglial signatures and their role in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018; 19(10): 622-635. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0057-5>
- Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, García-Gonzalo FR, Rosa JL et al. TSC1 Stabilizes TSC2 By Inhibiting the Interaction between TSC2 and the HERC1 Ubiquitin Ligase. *JBC.* 2006; 281(13): 8313-8316. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500451200>
- Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell.* 2018; 173(5): 1073-1081. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.05.003>
- Dusart I, Guenet JL, Sotelo C. Purkinje cell death: Differences between developmental cell death and neurodegenerative death in mutant mice. *Cerebellum.* 2016; 5(2): 163-173. <https://doi.org/10.1080/14734220600699373>
- García-Cano J, Martínez-Martínez A, Sala-Gaston J, Pedrazza L, Rosa JL. HERCing: Structural and Functional Relevance of the Large HERC Ubiquitin Ligases. *Front. Physiol.* 2019; 10(1014): 1-10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2019.01014>

- García-Gonzalo FR, Rosa JL. The HERC proteins: functional and evolutionary insights. *Cell Mol Life Sci*. 2005; 62(16): 1826-1838. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5119-y>
- Hagemeyer N, Hanft KM, Akriditou MA, Unger N, Park ES, Stanley ER et al. Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood. *Acta Neuropathol*. 2017; 134(3): 441-458. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1747-1>
- Marr, D. A theory of cerebellar cortex. *J. Physiol*. 1969; 202(2): 437-470. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1969.sp008820>
- Mashimo T, Hadjebi O, Amair-Pinedo F, Tsurumi T, Langa F, Serikawa T, et al. Progressive Purkinje cell degeneration in *tambaleante* mutant mice is a consequence of a missense mutation in HERC1 E3 ubiquitin ligase. *PLoS Genet*. 2009; 5(12): 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000784>
- Pérez-Villegas EM, Negrete-Díaz JV, Porrás-García ME, Ruiz R, Carrión AM, Rodríguez-Moreno A et al. Mutation Of The HERC1 Ubiquitin Ligase Impairs Associative Learning In The Lateral Amygdala. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(2): 1157-1168. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0371-8>
- Pérez-Villegas EM, Ruiz R, Bachiller S, Ventura F, Armengol JA, Rosa JL. The HERC proteins and the nervous system. *Semin Cell Dev Biol*. 2022; 132: 5-15. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2021.11.017>
- Porrás-García EM, Ruiz R, Pérez-Villegas EM, Armengol JA. Motor learning of mice lacking cerebellar Purkinje cells. *Front Neuroanat*. 2013; 7(4): 1-8. <https://doi.org/10.3389/fnana.2013.00004>
- Ruiz R, Armengol JA, Venero JL, García-Domínguez I, Roca-Ceballos MA, Pérez-Villegas EM. Early activation of microglia in *tambaleante* mouse model preceding neuronal cerebellar death. 11th FENS Forum Of Neuroscience (Berlin). 2018.
- Ruiz R, Pérez-Villegas EM, Bachiller S, Rosa JL, Armengol JA. HERC1 Ubiquitin Ligase Mutation Affects Neocortical, CA3 Hippocampal and Spinal Cord Projection Neurons: An Ultrastructural Study. *Frontiers in Neuroanatomy*. 2016; 10(42): 1-15. <https://doi.org/10.3389/fnana.2016.00042>
- Safaiyan S, Besson-Girard S, Kaya T, Cantuti-Castelvetri L, Liu L, Ji H et al. White matter aging drives microglial diversity. *Neuron*. 2021; 109(7): 1100-1117. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.01.027>
- Sánchez-Tena S, Cubillos-Rojas M, Schneider T, Rosa JL. Functional and pathological relevance of HERC family proteins: A decade later. *Cell Mol Life Sci*. 2016; 73(10): 1955-1968. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2139-8>
- Schneider, T. Papel de la E3 Ubiquitina Ligasa HERC1 en las vías de señalización celular de las MAPKs y en la autofagia. Barcelona: Unidad de Bioquímica y Biología Molecular del Departamento de Ciencias Fisiológicas; 2017.
- Stowell RD, Wong EL, Batchelor HN, Mendes MS, Lamantia CE, Whitelaw BS et al. Cerebellar Microglia are Dynamically Unique and Survey Purkinje Neurons *In Vivo*. *Dev Neurobiol*. 2018; 78(6): 627-644. <https://doi.org/10.1002/dneu.22572>

- Tang Y, Le W. Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol.* 2016; 53(2): 1181-1194. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-9070-5>
- Thomas L, Pasquini LA. Galectin-3-Mediated Glial Crosstalk Drives Oligodendrocyte Differentiation and (Re)myelination. *Front Cell Neurosci.* 2018; 12(297): 1-16. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00297>
- Treuting PM, Dintzis SM, Montine KS. *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat and Human Atlas.* 2^a ed. Nueva York: Academic Press; 2017.
- Yang RY, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med.* 2008; 10(17): 1-24. <https://doi.org/10.1017/S1462399408000719>