



CDH1 REGULA LA MIELINIZACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

SILVIA GOMILA HUGUET

DIRECTORAS:

DRA. ÁNGELES ALMEIDA PARRA

DRA. VERÓNICA BOBO JIMÉNEZ

CDH1 REGULA LA MIELINIZACIÓN DURANTE EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

SILVIA GOMILA HUGUET

DIRECTORAS:

DRA. ÁNGELES ALMEIDA PARRA

DRA. VERÓNICA BOBO JIMÉNEZ

La Dra. Ángeles Almeida Parra, Investigadora Científica del CSIC, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica (IBFG, Universidad de Salamanca, CSIC), Jefe de Grupo en el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL, Hospital Universitario de Salamanca, Universidad de Salamanca, CSIC) y Profesora Asociada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Salamanca

La Dra. Verónica Bobo Jiménez, investigadora postdoctoral del IBSAL y del IBFG

CERTIFICAN:

Que el trabajo doctoral realizado bajo su dirección por D^a Silvia Gomila Huguet, titulado "Cdh1 regula la mielinización durante el desarrollo del Sistema Nervioso Central", reúne las condiciones de originalidad requeridas para optar al grado de doctor por la Universidad de Salamanca y autorizan su presentación

Y para que aquí conste, firman la presente certificación en Salamanca, 15 de junio de 2023.



Fdo.: Ángeles Almeida Parra

Fdo.: Verónica Bobo Jiménez



R Plan de Recuperación,
Transformación
y Resiliencia



Este trabajo ha sido financiado con proyectos de investigación concedidos por el Instituto de Salud Carlos III (PI18/00103, PI21/00727, RD21/0006/0005 co-financiado por la Unión Europea) y la Junta de Castilla y León (CSI151P20; Escalera de Excelencia CLU 2017-03 co-financiada por la Unión Europea). Silvia Gomila obtuvo un contrato predoctoral financiado por el Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca (IBSAL).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido presentados en:

- **19th National Meeting of the Spanish Society of Neuroscience.**

Lleida, 3-8 septiembre 2019.

Póster: APC/C-Cdh1 inhibition promotes hypomyelination during postnatal development. S. Gomila, V. Bobo-Jiménez, R. Lapresa, J. Agulla, A. Almeida.

- **I Jornada de Encuentro entre grupos de investigación del IBSAL**

Salamanca. 27 de mayo de 2022

Póster: APC/C-Cdh1 inhibition promotes hypomyelination during postnatal development. S. Gomila, V. Bobo-Jiménez, R. Lapresa, J. Agulla, A. Almeida.

- **12th FENS Forum of Neuroscience**

Paris, 9-13 de julio de 2022

Póster: APC/C-Cdh1 regulates myelination after birth. S. Gomila, V. Bobo-Jiménez, R. Lapresa, J. Agulla, A. Almeida.

- **II Jornada de Encuentro entre grupos de investigación del IBSAL**

Salamanca, 13 de junio de 2023

Póster: APC/C-Cdh1 new function? S. Gomila, V. Bobo-Jiménez, R. Lapresa, J. Agulla, J.P. Bolaños, A. Almeida.

- **1st Severo Ochoa Conference**

Salamanca, 29-30 de julio de 2023

Póster: APC/C-Cdh1 complex controls lipid metabolism and myelination in the postnatal brain development. S. Gomila, V. Bobo-Jiménez, R. Lapresa, J. Agulla, J.P. Bolaños, A. Almeida.

- **XVI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease**

Berlín, 8-11 de julio de 2023

Póster: APC/C-Cdh1 regulates myelination after birth. S. Gomila, V. Bobo-Jiménez, R. Lapresa, J. Agulla, J.P. Bolaños, A. Almeida.

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS | 9 |
| INTRODUCCIÓN | 13 |
| 1. Desarrollo del sistema nervioso central | 14 |
| 1.1. Formación de la corteza cerebral | 18 |
| 1.2. Formación del cuerpo caloso | 19 |
| 1.3. Trastornos del neurodesarrollo | 21 |
| 2. Oligodendrogénesis y mielinización del SNC | 23 |
| 2.1. Oligodendrogénesis | 25 |
| 2.1.1. Generación de los precursores de oligodendrocitos... | 25 |
| 2.1.2. Migración de los OPCs | 27 |
| 2.1.3. Proliferación y diferenciación | 28 |
| 2.2. Mielinización del SNC | 30 |
| 2.2.1. Composición de la vaina de mielina | 30 |
| 2.2.2. Funciones relevantes de la mielina | 32 |
| 2.2.3. Síntesis y mantenimiento | 33 |
| 2.2.4. Regulación de la mielinización | 36 |
| 2.3. Papel del metabolismo lipídico en la mielinización | 37 |
| 2.3.1. Factores de transcripción | 37 |
| 2.3.2. Colesterol | 37 |
| 2.3.3. Galactocerebrósidos | 38 |
| 2.3.4. Esfingomielinas | 38 |
| 2.3.5. Transportadores lipídicos | 39 |
| 3. Complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C) | 39 |
| 3.1. Estructura y reconocimiento de sustratos | 40 |
| 3.2. Funciones de APC/C-Cdh1 en el SNC | 41 |
| 3.2.1. Neurogénesis y diferenciación neuronal | 42 |
| 3.2.2. Supervivencia neuronal | 44 |
| 3.2.3. Crecimiento axonal | 46 |
| 3.2.4. Sinaptogénesis y dendritogénesis | 47 |
| 3.2.5. Plasticidad sináptica | 48 |
| 3.2.6. Metabolismo glucídico | 50 |
| 3.3. Regulación de APC/C-Cdh1 | 51 |
| HIPÓTESIS Y OBJETIVOS | 53 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 56 |
| 1. Experimentación animal procedimientos y modelo de investigación | 57 |
| 1.1. Establecimiento del modelo experimental | 57 |
| 2. Genotipado de animales | 59 |

| | |
|---|-----------|
| 2.1. Extracción del RNA | 59 |
| 2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 59 |
| 2.3. Electroforesis en geles horizontales de agarosa | 61 |
| 3. Resonancia magnética nuclear | 62 |
| 3.1. Adquisición de imágenes peso T2 | 62 |
| 3.2. Análisis de los valores del mapa T2 | 63 |
| 4. Estudios histológicos | 64 |
| 4.1. Obtención de muestras de tejido | 64 |
| 4.2. Inmunohistoquímica | 65 |
| 4.3. Tinción Nissl | 66 |
| 4.4. Ensayo BrdU in vivo | 67 |
| 5. Microscopía electrónica de transmisión | 68 |
| 5.1. Fijación del tejido | 68 |
| 5.2. Deshidratación e inclusión | 68 |
| 5.3. Corte y contrastado | 69 |
| 6. Análisis de imágenes | 69 |
| 7. Determinación de la expresión de proteínas mediante análisis de transferencia tipo Western blot | 70 |
| 7.1. Extracción de proteínas | 70 |
| 7.2. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE | 71 |
| 7.3. Inmunodetección de proteínas por western blot | 71 |
| 7.4. Cuantificación | 73 |
| 7.5. Stripping de membranas | 73 |
| 8. Obtención y manipulación del RNA | 73 |
| 8.1. Extracción del RNA total | 73 |
| 8.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real | 74 |
| 9. Estudio metabolómico | 76 |
| 10. Tratamiento estadístico de los resultados | 77 |
| RESULTADOS | 78 |

| | |
|---|-----------|
| 1. Establecimiento de un modelo murino deficiente en Cdh1 durante el neurodesarrollo postnatal | 79 |
| 1.1. Antecedentes experimentales | 79 |
| 1.2. Caracterización fenotípica del modelo murino deficiente de Cdh1 en el sistema nervioso | 81 |
| 1.3. La deficiencia de Cdh1 promueve disgenesia del cuerpo caloso..... | 86 |
| 2. La inactivación de APC/C-Cdh1 altera la mielinización postnatal..... | 89 |

| | |
|--|------------|
| 2.1. La ausencia de Cdh1 provoca hipomielinización en el encéfalo | 89 |
| 2.2. La falta de Cdh1 retrasa la mielinización postnatal | 93 |
| 2.3. La hipomielinización postnatal causada por la falta de Cdh1 no es consecuencia de pérdida de axones mielinizables | 96 |
| 3. Cdh1 regula la proliferación de OPCs, pero no es imprescindible para su diferenciación a oligodendrocito | 102 |
| 3.1. La falta de Cdh1 reduce el número de oligodendrocitos en el cuerpo calloso | 102 |
| 3.2. La falta de Cdh1 incrementa la proliferación de OPCs y altera su morfología | 104 |
| 3.3. APC/C-Cdh1 no es imprescindible para la diferenciación postnatal de los oligodendrocitos | 111 |
| 4. APC/C-Cdh1 es esencial para la correcta formación de la vaina de mielina | 115 |
| 4.1. La ausencia de Cdh1 reduce el espesor de la mielina y el número de axones mielinizables | 116 |
| 4.2. La ausencia de Cdh1 desestructura la vaina de mielina . | 118 |
| 5. APC/C-Cdh1 es esencial para el mantenimiento de la homeostasis lipídica en el cerebro | 119 |
| 5.1. La falta de Cdh1 reduce los componentes lipídicos de la vaina de mielina | 123 |
| DISCUSIÓN | 127 |
| CONCLUSIONES | 139 |
| BIBLIOGRAFÍA | 143 |

ABREVIATURAS

ADLD: Leucodistrofia autosomal dominante

AgO: Agitación orbital

APC/C: Anaphase promoting complex/Cyclosome

Ascl1: Achaete-scute homolog 1

BCA: ácido bicíncónico

Bcl-xL: B-cell lymphoma-extra large

BrdU: 5-bromo-2-desoxiuridina $C_9H_{11}BrN_2O_5$

BSA: albúmina sérica bovina

CC1: Adenomatous polyposis coli clone CC1

Cdk1 Cyclin-dependent kinase 1

Cdk5: Cyclin-dependent kinase 5

Cdks: cyclin-dependent kinase

cKO: Knockout condicional

CNP: 2',2'-cyclic nucleotide phosphodiesterase

Cre: Cre recombinasa

DEPC: dietilpirocarbonato

DNA: ácido desoxirribonucleico

E: Día embrionario

EDTA: ácido etilendiaminatetraacético

Emi1: Early meiotic induction protein 1

FDFT1: Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1

FMRP: Fragile X mental retardation

FOV: Field of view

Galc: Galactosiceramida

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

GluR: Glutamate receptor

h: Horas

H₂O_d: Agua destilada

HIF: Hypoxia-inducible factor

HMG-CoA: hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor

Id2: DNA-binding protein inhibitor ID-2

Id4: DNA-binding protein inhibitor ID-4

Igf1: Insulin-like growth factor

MAG: Myelin associated glycoprotein

MAP: Proteínas asociadas a microtúbulos

MBP: Myelin basic protein

MCT1: Monocarboxylate transporter 1

MCT8: Monocarboxylate transporter 8

Mdm2: Murine double minute 2

min: Minutos

MOG: Myelin oligodendrocyte glycoprotein

MRF: Myelin regulatory factor

MSME: Multi slice multi eco

mTOR: Mammalian target of rapamycin

Myrf: Myelin regulatory factor

MYT1: Myelin transcription factor

NaF: fluoruro sódico

NF200: Neurofilament heavy chain

NG2: Chondroitin sulfate proteoglycan

Ngn2: Neurogenin 2

Nkx2.1: NK2 homebox 1

NKx2.2: NK2 homebox 2

NPCs: Precursores neurales

Olig1: Oligodendrocyte transcription factor 1

Olig2: Oligodendrocyte transcription factor 2

OLs: Oligodendrocitos

OPC's: Precusores de oligodendrocitos
OSVZ: Outer Subventricular zone
P: Días postnatal
PB: Tampón fosfato
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
PDGFR α : Platelet derived growth factor α
PFA: Paraformaldehido
PFK1: Fosfofructoquinasa 1
PFKFB3: 6-fosfofructosa-2-kinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa
PLP: Proteolipid protein
PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
PSD-95: Postsynaptic density-95
RGC: Células de la glía radial
RMN: Resonancia magnética nuclear
RNA: ácido ribonucleico
Rock2: Rho-associated protein kinase 2
ROI: Región de interés
RT: Temperatura ambiente
rt-qPCR: PCR a tiempo real
S.E.M. → Error estándar de la media
S1P: Esfingosina-1-fosfato
SCF: Skp1 Cullin1 F-box ligase
SDS: dodecilsulfato sódico
Shh: Sonic hedgehog
SNC: Sistema nervioso central
Sox10: SRY-box transcription factor 10
Sox2: SRY-box transcription factor 2
SREBP: Sterol regulatory element binding protein

Tcf4: Transcription factor 7-like-4

TEA: Trastornos del espectro autista

TLCK: tosil lisina clorometil cetona

TPCK: N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona

TPR: Tetrateicopeptide repeat

TSC1: Tuberous sclerosis complex

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

ZSV: Zona subventricular

ZV: Zona ventricular

INTRODUCCIÓN

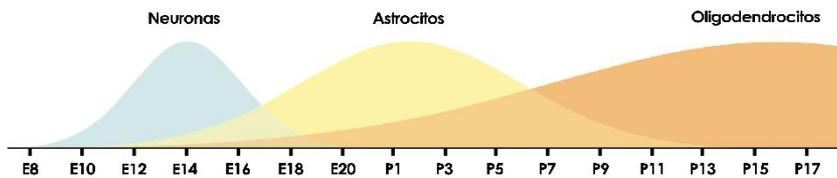
1. DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

El desarrollo del cerebro es un proceso complejo, temporal y espacialmente regulado, que tiene lugar desde etapas tempranas del desarrollo embrionario hasta la adolescencia. Durante este proceso, las células neurales proliferan, diferencian y se conectan entre sí para establecer redes complejas, que permitan el procesamiento de la información y el control de las funciones del organismo (Bakken et al., 2016).

En términos generales, el origen del sistema nervioso central (SNC) se establece por la inducción ejercida por las interacciones tisulares entre el ectodermo, el mesodermo paraxial y la notocorda. A medida que las células van adquiriendo propiedades neurales, se forma la placa neural que, a su vez, eleva sus bordes, que confluyen y se fusionan en la línea media para formar el tubo neural. Este proceso se denomina neurulación (Avagliano et al., 2019; Placzek et al., 1990). En este punto, las células se dividen rápidamente, aunque heterogéneamente, a lo largo del tubo. Posteriormente, la región craneal del tubo neural se expande y forma tres vesículas: la vesícula más rostral, denominada prosencéfalo o cerebro anterior, la vesícula media, conocida como mesencéfalo o cerebro medio, y la vesícula más caudal, que es el rombencéfalo o cerebro posterior. En dirección caudal al rombencéfalo, el tubo neural permanece del mismo diámetro y formará la médula espinal (Ishikawa et al., 2012). Finalmente, el cerebro se pliega varias veces sobre sí mismo para formar las estructuras definitivas del cerebro maduro (Kandel, 2001; Stiles & Jernigan, 2010).

Durante el desarrollo de la corteza cerebral surgen dos zonas germinales de forma secuencial, las cuales generan diferentes tipos de células corticales. En los ratones, la primera en originarse es la zona ventricular (ZV), que dará lugar a neuronas y glía radial. La neurogénesis comienza el día 9 embrionario (E), alcanzando su máximo a E14-E15. La zona subventricular (ZSV), situada dorsalmente a la ZV, se desarrolla en

E14 y se convierte en la zona germinal primaria del cerebro en E19. Las células que se originan en la SVZ a finales de los días de vida embrionaria y a principios de la postnatal, se destinan predominantemente a los linajes gliales, produciéndose la máxima formación de astrocitos entre el día postnatal (P) 0 y P2, mientras que los oligodendrocitos (OLs) alcanzan la cumbre a P14 (Allen & Lyons, 2018; Sauvageot & Stiles, 2002) (**Esquema1**).



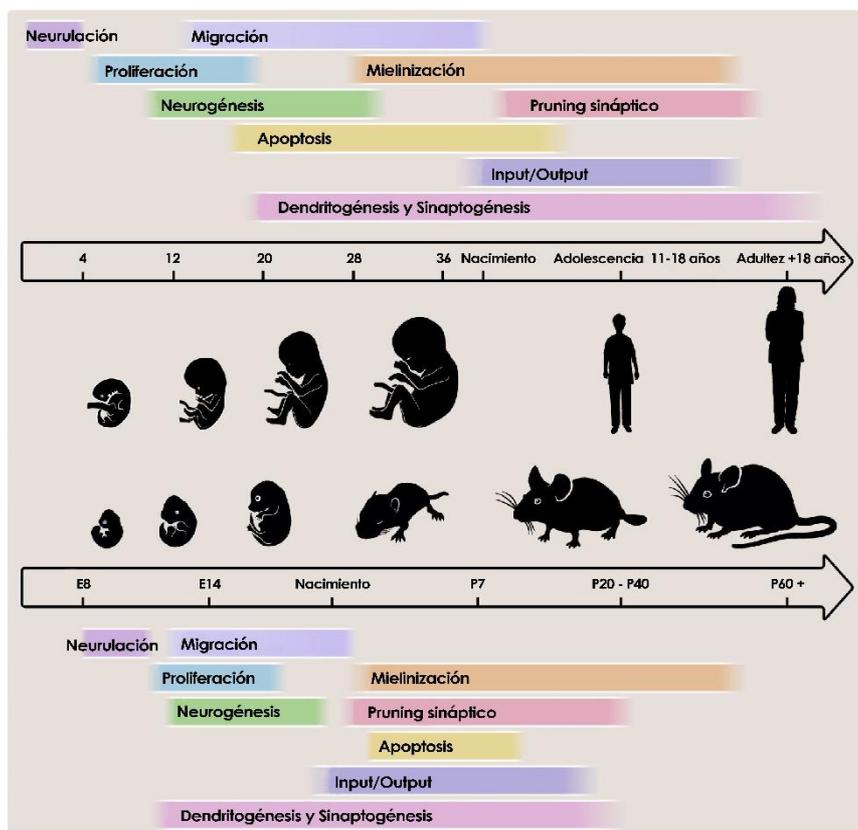
Esquema 1. Temporalización del origen celular del SN del ratón. Formación de los tres principales tipos celulares del sistema nervioso central. (Adaptado de Sauvageot, 2002) (Allen & Lyons, 2018)

Esta temporalización es estrictamente necesaria, dado el alto grado de coordinación entre los diferentes procesos del desarrollo del SNC. La sinaptogénesis coincide con la generación de los astrocitos, los cuales secretan trombospondinas y glipicanos que promueven la maduración neuronal y sináptica (Cheng et al., 2016; Farhy-Tselnicker et al., 2017). Además, las neuronas recién formadas deben integrarse en los circuitos extendiendo sus axones y dendritas para establecer sinapsis (Wefelmeyer et al., 2016). Durante este periodo, los astrocitos ejercen de soporte de la red neuronal (Allen & Lyons, 2018). La sobreproducción de sinapsis permite adaptar y modelar los circuitos neuronales (Chini & Hanganu-Opatz, 2021). Sin embargo, la densidad sináptica disminuye durante la adolescencia mediante un proceso denominado poda o pruning sináptico, necesario para la redefinición y maduración de los circuitos neuronales (Koyama & Ikegaya, 2015), y en el que participan tanto los astrocitos como la microglía (Allen & Lyons, 2018).

Por otro lado, el proceso de mielinización contribuye a la estabilización y maduración de las conexiones neuronales, facilitando la transmisión del impulso nervioso y aportando protección y nutrientes a los axones (R. G. Almeida & Lyons, 2017a). Sin embargo, también ejercen funciones adicionales. Tanto los precursores de oligodendrocitos (OPCs) como los OLs maduros mielinizantes, expresan una gran variedad de receptores sinápticos y canales iónicos que les permiten mediar en la actividad neuronal. Así, los OPCs ayudan a mantener la homeostasis de potasio en el espacio extracelular sináptico (Maldonado et al., 2013). Además, participan indirectamente en la homeostasis del glutamato, promoviendo su absorción por parte de los astrocitos (Birey et al., 2017). La proteólisis de NG2 (Chondroitin sulfate proteoglycan), proteína de superficie expresada por los OPCs, promueve la actividad sináptica a través de la estabilización de c-Fos (Xin & Chan, 2020). Recientemente, Auguste y colaboradores describieron la capacidad fagocitaria de los OPCs eliminando las sinapsis aberrantes durante la redefinición de los circuitos (Auguste et al., 2022). Por tanto, los OLs cambian y remodelan los circuitos neuronales durante el neurodesarrollo postnatal.

Los procesos de neurulación, proliferación, migración y diferenciación están regulados principalmente por factores de transcripción, mientras que la dendritogénesis, sinaptogénesis y el refinamiento de los circuitos dependen del entorno y de factores extrínsecos (Chini & Hanganu-Opatz, 2021). Las ubiquitininas juegan un papel importante durante el desarrollo embrionario coordinando la progresión celular, la diferenciación, la apoptosis y la migración de las células neurales, a través de la activación de importantes vías de señalización, entre ellas Shh (Sonic hedgehog), Wnt/ β -catenina y ciclinas-Cdk's (quinasas dependientes de ciclinas). Al mismo tiempo, se localizan en distintos compartimentos subcelulares de las neuronas, como el núcleo, el citoesqueleto de axones y dendritas y las sinapsis, modelando la morfología neuronal y la conectividad de los circuitos (Fuchsberger et al., 2017).

El **Esquema 2** resume el desarrollo del cerebro desde la etapa embrionaria hasta la madurez, comparando la temporalización entre humano y ratón. Aunque los procesos individuales se desarrollen en distintos tiempos, la similitud en el patrón es evidente entre ambas especies (Chini & Hanganu-Opatz, 2021). Así, los modelos murinos se han convertido en una potente herramienta para dilucidar los mecanismos moleculares y fisiopatológicos del desarrollo cerebral (Hafezparast et al., 2002).



Esquema 2. Comparativa de los principales procesos durante el neurodesarrollo entre humano y ratón. Aunque el desarrollo general es similar en las dos especies, los procesos individuales ocurren en puntos temporales diferentes. (Adaptado de Chini & Hanganu-Opatz, 2021).

1.1. Formación de la corteza cerebral

La corteza cerebral es una estructura laminar, parcialmente organizada en capas horizontales para maximizar el potencial conectivo de los circuitos neuronales (Watakabe et al., 2007). Las neuronas corticales derivan de las células neuroepiteliales, progenitores situados en la ZV. En la primera etapa embrionaria, se dividen sucesivamente de manera simétrica con la finalidad de mantener el pool de precursores. A continuación, se dividen asimétricamente para generar células de la glía radial (RGC). Las RGCs, a su vez, se dividen asimétricamente para mantener la autorrenovación celular y generar precursores intermediarios, que migrarán a través de las proyecciones de la glía radial hasta la placa cortical, donde se dividirán y formarán dos neuronas idénticas. Una vez alcanzan su posición final en las distintas capas de la corteza, las neuronas maduran y establecen conexiones (Agirman et al., 2017a; Guarnieri et al., 2018).

La formación de la corteza cerebral está regulada por las vías de señalización clásicas Shh y Wnt/ β -catenina, entre otras. Ambas rutas inducen la activación de factores de transcripción y reguladores del ciclo celular, entre ellos Nkx2.1 y ciclinas D1/2, que promueven la proliferación de los precursores neurales (NPCs) y aseguran el linaje neuronal (Agirman et al., 2017b). Los factores de transcripción Ascl1 y Ngn2 se expresan en RGCs y modulan la derivación al linaje neuronal. De hecho, mutaciones en estos factores inducen diferenciación prematura de los astrocitos, alterando gravemente la neurogénesis cortical (Martynoga et al., 2012).

En este sentido, nuestro grupo demostró que el complejo APC/C-Cdh1 es esencial para la neurogénesis cortical y el tamaño cerebral. La delección de Cdh1, principal activador de APC/C en las neuronas (A. Almeida et al., 2005a), promovió el alargamiento de la fase S en los precursores neurales, derivando en estrés replicativo y la consecuente muerte celular mediada por p53. Así, la inactivación de APC/C-Cdh1 redujo el espesor de la corteza cerebral y promovió la aparición de

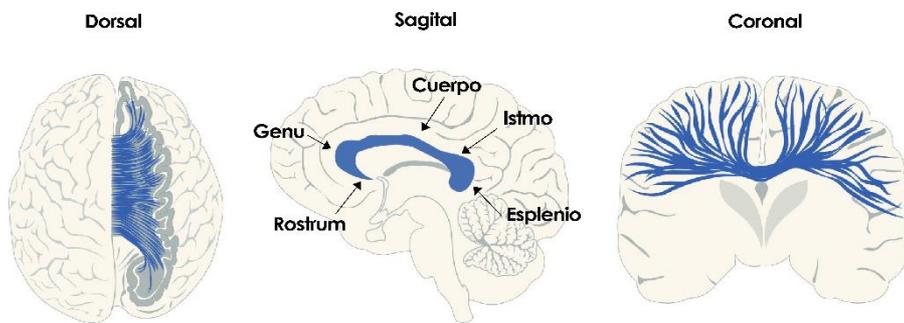
microcefalia, alteraciones relacionadas con trastornos del neurodesarrollo (Delgado-Esteban et al., 2013a). Asimismo, la vía de señalización de mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) también coordina la corticogénesis. El silenciamiento de mTOR en los NPCs aumenta su proliferación, alterando la migración de los precursores y promoviendo la aparición de capas corticales aberrantes (Guarnieri et al., 2018). La delección de Raptor en los progenitores corticales provoca microcefalia. En este estudio se observó una estratificación cortical densa, sin embargo, el posicionamiento de las neuronas no se vio afectado, lo que sugiere que la activación de mTOR1 es necesaria para la diferenciación y migración durante la corticogénesis (Licausi & Hartman, 2018).

1.2. Formación del cuerpo calloso

El cuerpo calloso es el mayor haz de fibras nerviosas del cerebro de los mamíferos y, aproximadamente, está formado por 200 millones de axones de distintos diámetros y grados de mielinización (Paul, 2011; Tanaka-Arakawa et al., 2015a). Esta estructura es la principal vía de transferencia de información entre los hemisferios cerebrales (León de Reyes et al., 2020). La interconexión entre los hemisferios facilita la integración sensorial bilateral y las funciones cognitivas superiores, como son la representación multidimensional de la información, tareas asociativas y ejecutivas, coordinación de las respuestas sensoriomotoras, procesamiento intelectual y la gestión de los estímulos sociales y emocionales (León de Reyes et al., 2020).

La formación del cuerpo calloso se inicia durante el periodo embrionario y continúa durante el desarrollo postnatal. En etapas tempranas del desarrollo, el telencéfalo comprende los dos hemisferios cerebrales, derecho e izquierdo, y una pequeña línea media situada en la porción anterior del tercer ventrículo. Los dos hemisferios cerebrales se encuentran separados de forma incompleta por la principal comisura interhemisférica del cerebro, cuyo suelo está formado por una amplia

banda de fibras comisurales, que constituyen el cuerpo calloso, principal vía de unión entre los hemisferios (Raybaud, 2019). Las neuronas corticales de la corteza cingulada son las primeras en elongar los axones y proyectarlos a través de la comisura. Estos axones pioneros sirven de guía para el resto de las neuronas corticales, permitiendo la formación del cuerpo calloso, siguiendo una dinámica rostral a caudal (León de Reyes et al., 2020). Finalmente, durante el periodo postnatal, y hasta los 2 años de vida en el caso de los humanos (Paul, 2011), el cuerpo calloso sufre un refinamiento que moldea y redefine las fibras nerviosas. Este proceso depende, mayoritariamente, de la actividad neuronal de los axones y del proceso de mielinización (León de Reyes et al., 2020; Paul, 2011; Raybaud, 2019).



Esquema 3. Morfología del cuerpo calloso humano. Estructura del cuerpo calloso visto desde distintos cortes histológicos: dorsal, sagital y coronal. (Adaptado de León de Reyes et al., 2020).

La estructura del cuerpo calloso consta principalmente de cinco tractos nerviosos que conectan distintas partes de los hemisferios. Se encuentran de rostral a caudal: *rostrum*, *genu*, *cuerpo*, *istmo* y *esplénio* (**Esquema 3**) (Goldstein et al., 2023).

Rostrum: zona del cuerpo calloso que se sitúa en la parte frontal inferior. Se trata de la parte más anterior de la estructura y nace de la lámina terminal. Está conectado con el quiasma óptico.

Genu: zona que se curva hacia el interior del cerebro. Se dirige hacia los lóbulos frontales para formar el *forceps* menor. Las fibras de esta parte del cuerpo calloso conectan con la corteza prefrontal de los hemisferios, permitiendo que se integre la información.

Cuerpo: conecta con el septum y el trigono cerebral, siendo una estructura esencial de conexión con el tálamo, el hipotálamo, el hipocampo y otras regiones del sistema límbico.

Istmo: forma la región posterior del cuerpo calloso y su principal cometido es unir los lóbulos temporales, que están implicados en el procesamiento de la información auditiva y visual, así como en la memoria, el aprendizaje, el desarrollo de las emociones y el habla.

Esplenio: es la parte final del cuerpo calloso. Se encuentra formado por fibras de proyección y asociativas. Se conecta con el lóbulo occipital para formar el *forceps* mayor, y también se vincula al ventrículo lateral hasta el punto de formar una de sus paredes interiores. También conecta con la glándula pineal y la comisura habenuar. Esto explica que lesiones en esta región den lugar a problemas para leer en voz alta y dificultades para dar nombre a los colores.

La mayoría de las fibras conectan regiones homotópicas, es decir, la organización de las fibras se correlaciona con la distribución rostro-caudal de las áreas corticales funcionales. Aunque algunas conexiones callosas son inhibitorias, y permiten que los hemisferios se inhiban mutuamente para maximizar la función independiente, la mayoría son excitatorias e integran información entre los hemisferios (Blaauw & Meiners, 2020; Paul, 2011).

1.3.Trastornos del neurodesarrollo

Los trastornos del neurodesarrollo engloban una gran variedad de enfermedades, variables en su etiología, aunque con una consecuencia común: alteraciones en el desarrollo estructural y/o funcional del cerebro. Mayoritariamente, el origen de los trastornos del neurodesarrollo

es multifactorial y las manifestaciones clínicas, como la discapacidad intelectual y disfunciones cognitivas y motoras, se comparten entre patologías, lo que dificulta su clasificación. Los trastornos del espectro autista (TEA) y el trastorno del déficit de atención son las neuropatologías más frecuentes (Thapar et al., 2017).

El autismo se caracteriza por alteraciones en la interacción social y comunicativa, así como por comportamientos repetitivos y restrictivos. La severidad clínica de los pacientes con TEA abarca un rango amplio, desde pequeñas disfunciones cognitivas hasta discapacidad intelectual, convulsiones y problemas motores (Pinto et al., 2014). El síndrome del cromosoma X Frágil es la causa monogenética más frecuente de discapacidad intelectual hereditaria y TEA (Lubs, 1969). La mutación en la proteína FMRP (*Fragile X Mental Retardation*), promueve la aparición de espinas dendríticas aberrantes, disfunción sináptica e hipomielinización (Wang, 2015).

Los trastornos de la formación cortical son un grupo heterogéneo de malformaciones de la corteza cerebral, mayoritariamente causado por neurogénesis excesiva o defectiva, migración aberrante o alteraciones en la diferenciación neuronal (Razek et al., 2009). El incremento o la reducción de la proliferación de los NPCs modifica el tamaño cerebral, provocando macrocefalia o microcefalia, respectivamente. En ambos casos, las malformaciones cursan juntamente con retraso del crecimiento, discapacidad intelectual y epilepsia (Guarnieri et al., 2018).

Las alteraciones de los patrones de actividad interhemisférica y/o en la formación del cuerpo calloso, aparecen en muchos trastornos del neurodesarrollo, incluyendo agenesia parcial o total del cuerpo calloso, TEA, esquizofrenia y epilepsia (León de Reyes et al., 2020). La etiología de las malformaciones del cuerpo calloso varía desde causas genéticas hasta infecciones virales (Paul et al., 2007). Los mecanismos patológicos subyacentes son muy variados e implican, entre otros, alteraciones metabólicas, trastornos de la biosíntesis de proteínas y lípidos y estrés oxidativo (Köhler et al., 2018).

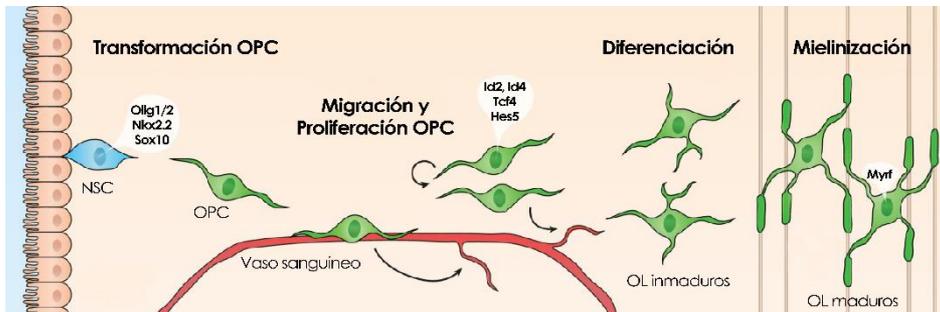
Las leucodistrofias son un grupo heterogéneo de trastornos hereditarios de las sustancia blanca, caracterizados por la afectación del desarrollo y mantenimiento de la mielina (Wolf et al., 2021). En el caso de la leucodistrofia autosomal dominante (ADLD), la sobreproducción de lámina B1 altera la migración de los OPCs modificando su morfología nuclear (Heng et al., 2013). Además, afecta directamente en la síntesis de lípidos promoviendo la aparición de "vacuolaciones" de la vaina de mielina (Rolyan et al., 2015).

2. OLIGODENDROGÉNESIS Y MIELINIZACIÓN DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Como se ha descrito anteriormente, el cuerpo calloso comunica zonas alejadas del cerebro a través de los axones mielinizados. La vaina de mielina permite la rápida y eficiente propagación de los potenciales de acción, además de proporcionar protección y soporte metabólico a los axones (van Tilborg et al., 2018). En el SNC, los oligodendrocitos son las células responsables de producir la mielina, presentando como característica particular la capacidad de mielinizar varios axones al mismo tiempo (entre 40 y 60 axones) (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Naruse et al., 2017). Las células de Schwann, homólogos a los OLs en el SN periférico, solamente pueden mielinizar un único axón a la vez. No obstante, la homología entre ambos tipos celulares es muy alta (Cristobal & Lee, 2022).

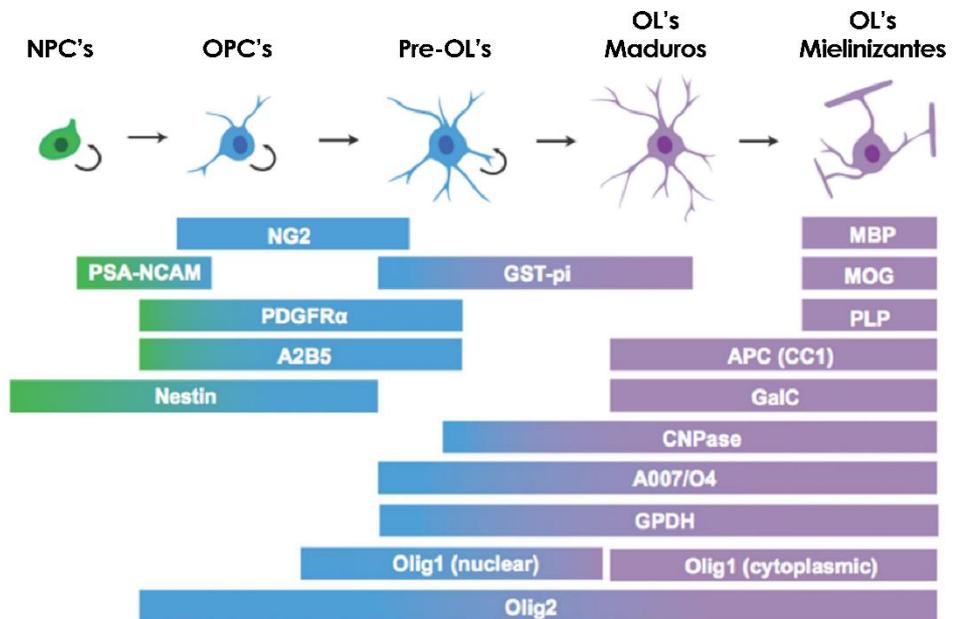
Los oligodendrocitos presentan una serie de fenotipos celulares, que abarca desde células madre indiferenciadas hasta células maduras capaces de sintetizar mielina (**Esquema 2**). Los OLs derivan del *pool* de progenitores del neuroepitelio cercano a la SVZ. Los NPCs se transforman al linaje oligodendroglial bajo la influencia de factores de transcripción específicos Olig1, Olig2, NKx2.2 y Sox10. Los OPCs migran, a través de los vasos sanguíneos, hacia sus posiciones finales, dónde determinados factores de transcripción (Id2, Id4, Tcf4 y Hes5) coordinan su proliferación. A continuación, los OPCs diferencian a pre-oligodendrocitos (pre-OLs),

que se transforman en oligodendrocitos inmaduros, y, finalmente, en OLs maduros mielinizantes (Baumann & Pham-Dinh, 2001; Emery, 2010; Mitew et al., 2014; van Tilborg et al., 2018). En posteriores apartados de la memoria se detallan estos procesos.



Esquema 4. Proceso oligodrogénico. Representación esquemática del desarrollo de los oligodendrocitos y los principales factores de transcripción que coordinan el proceso (Modificado de (van Tilborg et al., 2018).

La expresión de marcadores específicos por parte de los OLs nos permite estudiar la progresión de los OPCs durante la oligodrogénesis (**Esquema 5**). Varios factores de transcripción determinantes en la transformación de los NPCs a oligodendrocitos, como son Olig1 y Olig2, se expresan a lo largo de todo el linaje. Las proteínas de membrana NG2 (Antígeno neural/glial 2), PDGFR α (*Platelet derived growth factor α*) y A2B5, permiten etiquetar y rastrear los OPCs. La diferenciación de los progenitores induce la expresión de O4 y CNP (3'-fosfodiesterasa 2',3' cíclica nucleótido), los cuales mantienen sus niveles hasta estadios mielinizantes. Otras proteínas de superficie, como CC1 y GalC (Galactosilceramida) indican la maduración de los OLs. Durante las etapas finales del linaje, los oligodendrocitos empiezan a producir mielina y expresan marcadores exclusivos de la mielinización, como la proteína básica de la mielina (MBP), la glicoproteína del oligodendrocito asociada a la mielina (MOG), y la proteína proteolipídica (PLP). El estudio de estos marcadores es crucial para comprender las etapas y la regulación de la oligodrogénesis, durante el desarrollo como en la etapa adulta (Bernardo et al., 2021; Breton et al., 2021; Nishiyama et al., 2009; Pepper et al., 2018).



Esquema 5. Marcadores específicos del linaje oligodendroglial. Cronograma de los distintos marcadores específicos de cada etapa de la oligodendrogénesis (Modificado de (Long et al., 2021)).

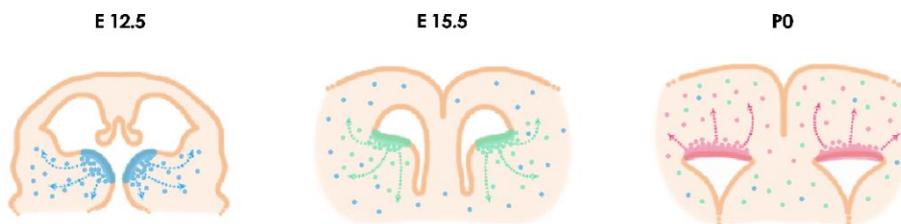
2.1. OLIGODENDROGÉNESIS

2.1.1. Generación de los precursores de oligodendrocitos

Los oligodendrocitos derivan de distintas olas oligodendrogénicas espacial y temporalmente diferenciadas. La primera ola tiene lugar a los 12,5 días embrionarios (E12,5) y los OPCs se originan en la eminencia ganglionar media. A medida que estos OPCs migran tangencialmente para ocupar todo el encéfalo, la corriente de generación de OPCs se desplaza a las eminencias ganglionares lateral y dorsal (E15,5). Al nacimiento, (P0), la tercera oleada de OPCs surge de la SVZ dorsal, y los progenitores migran lateralmente hacia la corteza cerebral, el cuerpo calloso, el fórnix y el estriado (**Esquema 6**) (Barateiro & Fernandes, 2014; Newville, Valenzuela, et al., 2017; van Tilborg et al., 2018). En el caso de los humanos, estos procesos están conservados y, adicionalmente, la zona cortical germinal OSVZ (*Outer SubVentricular Zone*) es capaz de generar

OPCs derivados de glía radial a través de mecanismos aún desconocidos (W. Huang et al., 2020).

Los OPCs derivados de la primera ola ventral se reemplazan, casi en su totalidad, durante el periodo postnatal. Al décimo día de vida postnatal (P10), la población de OPCs procede de las corrientes medial y dorsal. Kessaris y colaboradores describieron que, mediante la alteración de la segunda y tercera ola, los OPCs generados en la primera ola ventral, fueron capaces de sobrevivir, diferenciar y mielinizar el encéfalo. Así, demostraron la existencia de un mecanismo competitivo que permite una generación flexible de los OPCs, en el que la primera ola ventral actúa de reserva en caso de daño en las posteriores (Kessaris et al., 2006). No obstante, los mecanismos de eliminación y reemplazamiento de los OPCs ventrales sigue siendo una incógnita. Algunos autores sugieren que la propia competencia de los OPCs por los factores de supervivencia secretados por las neuronas y los astrocitos equilibra su población durante el proceso de mielinización (Newville, Jantzie, et al., 2017).



Esquema 6. Olas oligodendrogénicas del encéfalo. Representación esquemática de las distintas olas de generación de precursores de oligodendrocitos durante la etapa embrionaria. (Modificado de (Newville, Jantzie, et al., 2017).

A pesar de que comprenden sólo un 5% del total de las células cerebrales, los OPCs son las células más proliferativas del cerebro (Assetta et al., 2020). Además de la generación de los oligodendrocitos durante el desarrollo, los OPCs continúan proliferando y diferenciando, en menor medida, durante toda la vida. La mielina formada no sólo reemplaza a la existente, sino que abre caminos para la plasticidad

neuronal. Así, los oligodendrocitos son críticos en la adquisición de nuevas habilidades sensoriales y motoras, así como para la integración de funciones cognitivas (Noori et al., 2020; Saher & Stumpf, 2015; Salzer & Zalc, 2016).

2.1.2. Migración de los OPCs

Los OPCs son células muy proliferativas y migratorias, que favorecen su capacidad de adaptación a las necesidades de la red neuronal (Ozgen 2016). Su morfología bipolar característica es la que les confiere la gran capacidad migratoria que poseen (Bribián & de Castro, 2007). En el extremo de sus prolongaciones se pueden observar unas estructuras lamelipodiales, cuya forma y función es parecida a los conos de crecimiento neuronales, lo que facilitaría su interpretación de las señales del entorno (Thomason et al., 2020). Los OPCs, mayoritariamente, migran deslizándose por la superficie de los vasos, e incluso son capaces de moverse de un vaso a otro, marcando a la vascularización del cerebro como elemento esencial para la correcta migración de los precursores (Tsai et al., 2016). Es más, los OPCs son capaces de inducir la angiogénesis mediante la secreción de HIF1 α , posiblemente para asegurarse el aporte de oxígeno durante la mielinización, dada su alta demanda energética (Yuen et al., 2014).

Una gran variedad de moléculas señalizadoras y factores de crecimiento estimulan la migración de los OPCs. Shh, Wnt, PDGFR α , junto con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), inducen la migración de los precursores (Tilborg 2017) (van Tilborg et al., 2018). Los componentes extracelulares también juegan un papel relevante durante este proceso. Moléculas de adhesión como las semaforinas, trombospondinas, y la netrina facilitan la migración de los precursores (Baumann & Pham-Dinh, 2001; van Tilborg et al., 2018). Por el contrario, la proteína de membrana NG2 actúa como regulador negativo, estimulando la vía de señalización RhoA/Rock, afectando directamente a la fluidez del citoesqueleto (Binamé et al., 2013a).

La actividad neuronal es capaz de modular la migración de los OPCs, por ejemplo, a través de la unión del glutamato a los receptores NMDA. Su activación induce vías de señalización que, a su vez, promueven la síntesis de moléculas de adhesión (Li et al., 2013). Los OPCs también expresan GluA4 (receptor de glutamato), y su delección reduce la velocidad de migración y la distancia recorrida (Yattah et al., 2020).

2.1.3. Proliferación y diferenciación

Una vez que los OPCs han llegado a su destino, su proliferación incrementa significativamente la población oligodendroglial. Durante el desarrollo, la mayoría de factores reguladores de la proliferación actúan de manera indirecta inhibiendo la diferenciación (Elbaz & Popko, 2019; van Tilborg et al., 2018). Los factores de transcripción Id2, Id4 y Hes5, altamente expresados en los precursores, bloquean la diferenciación prematura de los OPCs (Tilborg 2017). El factor de transcripción de la mielina 1 (MYT1) (Nielsen 2004) y el complejo de esclerosis tuberosa 1 (TSC1) (Jiang et al., 2016), son la excepción, dado que directamente promueven la proliferación. Estudios en un modelo *knockout* (KO) de TSC1, sugieren que su delección mantiene los OPCs en fase G2/M, evitando su salida de ciclo e inhibiendo la proliferación (Jiang et al., 2016).

Durante el desarrollo postnatal, la microglía juega un papel clave, ya sea eliminando las sinapsis aberrantes a través del *pruning*, o bien, eliminando el exceso de OPCs. En los ratones, la denominada "fuente de la microglía" tiene lugar a P7, punto álgido de la proliferación (Zhang et al., 2018a). Cabe destacar que algunas enfermedades hipomielinizantes, como las leucodistrofias, presentan mutaciones en genes esenciales para la proliferación microglial y la fagocitosis, abriendo un nuevo campo inexplorado para el estudio del *pruning* sináptico en los trastornos hipomielinizantes (Nemes-Baran et al., 2020).

Del mismo modo que las neuronas, la diferenciación de los OLs parece ser un proceso terminal e irreversible, requiriendo un control estricto de los mecanismos de regulación de la mielinización, y al mismo

tiempo, del mantenimiento del *pool* de OPCs (Emery & Lu, 2015). Factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, se encargan de coordinar la diferenciación y maduración de los OLs. Los factores de transcripción *Ascl1*, *NKx2.2*, *Sox2* y *Sox10* son determinantes para la diferenciación. *Sox2* es esencial para la expansión de la población oligodendroglial, sin embargo, sus niveles disminuyen drásticamente al inicio de la diferenciación (Zhang et al., 2018a). Por otro lado, *Sox10* forma un complejo con *Myrf* para activar genes específicos de la mielina, como la proteína asociada a mielina (MAG) (Hornig et al., 2013). *Nkx2.2* por su parte, no juega un papel clave al inicio de la diferenciación, aunque su expresión es necesaria para la maduración de los oligodendrocitos (Qi et al., 2001).

Reguladores importantes del metabolismo lipídico, como son el colesterol y la proteína de unión al elemento regulador de esteroides (SREBP), participan en la maduración de los OLs. Monnerie y colaboradores demostraron que SREBP es capaz de modular la diferenciación de los OLs (Monnerie et al., 2017). Curiosamente, la inhibición de SREBP tanto en oligodendrocitos como en astrocitos reduce la síntesis de lípidos y retrasa la mielinización (Camargo et al., 2017), poniendo de manifiesto la importancia de la cooperación y simbiosis entre ambos tipos celulares.

Recientemente, las ubiquitininas están ganando protagonismo en la regulación del proceso oligodendrogénico. La E3 ubiquitina ligasa *Mdm2* coordina la maduración de los oligodendrocitos manteniendo los niveles del receptor quinasa 2 acoplado a la proteína G (*GRK2*) bajos (Fumagalli et al., 2015). Recientemente, Niu y colaboradores añadieron *Rnf43* a la lista de ubiquitininas que promueven la maduración de los oligodendrocitos. *Rnf43* inhibe la señalización *Wnt*, a través de la regulación de los niveles de proteínas intermediarias, induciendo así la expresión de genes mielinizantes (Niu et al., 2021).

Cabe destacar varios factores extrínsecos que también participan en la diferenciación de los OLs. Las hormonas tiroideas y el factor de

crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF1) son esenciales para la transformación morfológica durante la diferenciación, y la expresión de componentes de la mielina, entre ellos, MBP (Cristobal & Lee, 2022). Es más, mutaciones en el transportador de la hormona tiroidea MCT8 (monocarboxilato 8) reduce la síntesis de lípidos y proteínas específicas de la mielina, causando hipomielinización y daño axonal (Valcárcel-Hernández et al., 2022).

La plasticidad neuronal y mielinización se regulan recíprocamente. Las interacciones entre axón y oligodendrocitos se caracterizan por la alimentación recíproca entre actividad neuronal y mielinización. Las vesículas sinápticas y neurotransmisores estimulan la mielinización. Sin embargo, a su vez, la mielina regula la actividad neuronal a través de la conducción saltatoria y la homeostasis de iones (Mensch et al., 2015). Los OPCs expresan receptores de neurotransmisores, entre ellos, los receptores AMPA y GABA. La liberación de glutamato induce la diferenciación de los OPCs y adapta la producción de mielina a la actividad neuronal (Bercury & Macklin, 2015).

2.2. Mielinización del sistema nervioso central

2.2.1. Composición de la vaina de mielina

La mielina es una estructura multilaminar rica en lípidos encargada de aislar los axones y permitir la conducción saltatoria del impulso nervioso (Barnes-Vélez et al., 2023a). Los oligodendrocitos forman la vaina de mielina, creando una extensión de la membrana plasmática que envuelve en espiral los segmentos axonales (Saab & Nave, 2017). Sus propiedades bioquímicas la hacen única en su función y estructura. La mielina está compuesta por un 70% de lípidos, frente al 50-55% del resto de membranas plasmáticas. Los lípidos de la vaina no son específicos de la mielina, sino que la diferencia erradica en la proporción de estos. La mielina contiene un alto porcentaje de colesterol y fosfolípidos en comparación con el resto de las membranas plasmáticas (Barnes-Vélez et al., 2023a). Aproximadamente, la vaina está compuesta por: 72%

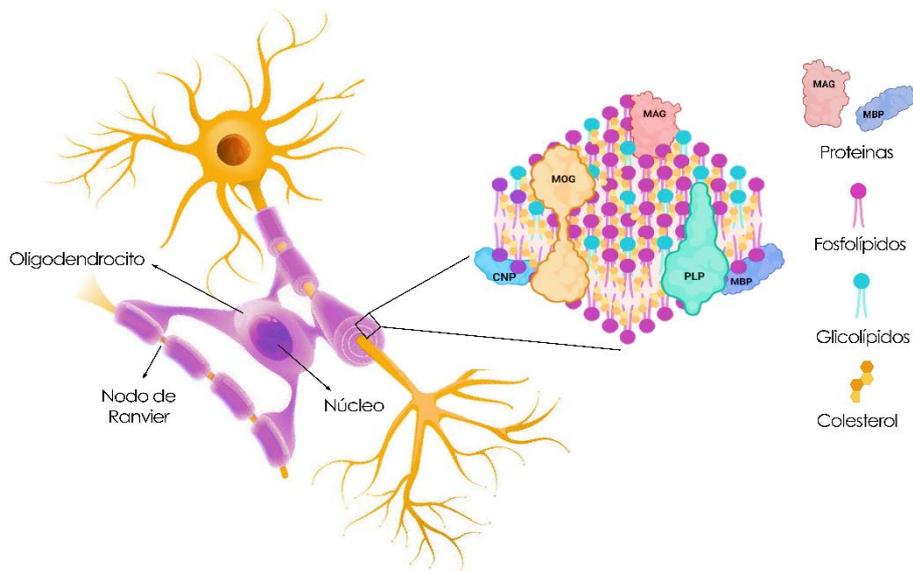
fosfolípidos, 20% colesterol, y 8% esfingolípidos (Sengottuvel et al., 2023a). Las cadenas laterales largas y mayoritariamente saturadas, son propiedades únicas que fomentan el plegamiento de las cadenas laterales, facilitando la compactación de la mielina (Saher & Stumpf, 2015) (**Esquema 7**).

Los fosfolípidos modulan numerosos procesos, señalización intracelular, autofagia, regulación de la muerte celular y diferenciación (Barnes-Vélez et al., 2023a; Giussani et al., 2021a). Es más, son capaces de prevenir la carbonilación y la agregación de proteínas derivados del estrés oxidativo, actuando como sistemas antioxidantes que mantienen la estructura y el empaquetamiento de la membranas lipídicas (Luoma et al., 2015). Además, junto con el colesterol, participan directamente en la compactación de la mielina, gracias a las interacciones trans entre los lípidos de la bicapa (Barnes-Vélez et al., 2023a).

El colesterol es estrictamente esencial para la formación de la mielina, siendo un factor limitante para el enrollamiento de la vaina. Participa activamente en la fluidez y permeabilidad de la vaina de mielina (Saher & Stumpf, 2015). Cuando se desarrollan lesiones en trastornos de la mielina como es el caso de la esclerosis múltiple, se pierde la capa aislante rica en colesterol. El colesterol de las vainas de mielina regeneradas debe reciclarse a partir de mielina dañada o producirse nuevamente de manera local. En el caso del daño crónico, a diferencia del daño agudo, casi ningún colesterol se recicla. En cambio, la nueva producción de colesterol determina la eficiencia de la reparación. Inesperadamente, no sólo las propias células formadoras de mielina, sino también las células nerviosas realizan una contribución importante a la regeneración, así la síntesis de colesterol en las células nerviosas asegura la reposición de las células formadoras de mielina (Berghoff et al., 2022).

La mielina contiene proteínas específicas, las más abundantes son la proteína proteolípida (PLP), y la proteína básica de la mielina (MBP). Otras proteínas estructurales como MOG, MAG y CNP, son características

de la vaina. MBP es una proteína multifuncional estrictamente necesaria para la formación de la mielina, no sólo por su directa participación en la unión de las láminas citoplasmáticas, sino también por regular la polimerización y estabilidad del citoesqueleto (Ozgen et al., 2016a). PLP también tiene un papel clave en la unión de las láminas extracelulares, aunque su importancia recae en el transporte del colesterol y la migración (Ozgen et al., 2016a).



Esquema 7. Estructura y composición de la mielina. Representación esquemática de los distintos componentes del sistema de bicapas miélicas. (Elaboración propia. App Biorender).

2.2.2. Funciones relevantes de la mielina

La principal función de la mielina es facilitar la transmisión sináptica a través del aislamiento axónico y la conducción saltatoria. La estructura y función de la vaina le confieren baja capacitancia, convirtiéndose en un gran aislante eléctrico. Cuando los canales de sodio localizados en el nódulo de Ranvier se excitan, el potencial de acción salta de un nódulo a otro, requiriendo poca energía para despolarizar la membrana. De

este modo, la conducción saltatoria permite la transmisión del impulso nervioso de manera más rápida y eficaz que en los axones no mielinizados (Kuhn et al., 2019; Nave, 2010; Simons & Trotter, 2007).

Además de favorecer la transmisión sináptica, los OLs proporcionan soporte nutricional y metabólico al axón. Las regiones mielinizadas denominadas internodos, están completamente aisladas del entorno (Bercury & Macklin, 2015a), lo que imposibilita la lanzadera de lactato entre astrocitos y neuronas (Bonvento & Bolaños, 2021a). Los oligodendrocitos realizan la glicólisis aeróbica. El piruvato y el lactato producido es suficiente para mantener la estructura y función de la mielina. El transportador de monocarboxilatos de tipo 1 (MCT1) expresado en los OLs maduros, proporciona lactato a las regiones mielinizadas de los axones. De esta manera, los oligodendrocitos facilitan la transmisión sináptica (Fünfschilling et al., 2012).

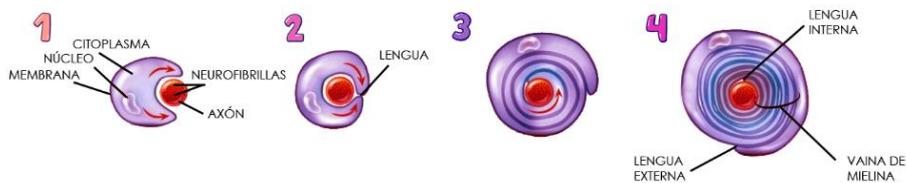
Los oligodendrocitos son capaces de regular negativamente el crecimiento axónico. Varias proteínas de membrana, entre ellas MAG y MOG, inhiben el desarrollo del cono axónico (Rigby et al., 2020). Estas proteínas son capaces de unirse al receptor Nogo y la vía de señalización RhoA/ROCK, provocando el colapso del cono axónico y la inhibición del crecimiento axonal (Fujita & Yamashita, 2014).

2.2.3. Síntesis y mantenimiento

Los OLs maduros mielinizantes deben someterse a cambios morfológicos, reordenamientos de membrana y citoesqueleto, y polarización para poder envolver los axones. El crecimiento de la mielina se produce por expansión radial y longitudinal, sintetizando membrana nueva en la punta de la lengua interna y expandiendo lateralmente la capa interna (Montani, 2021) (**Esquema 8**). Durante la formación de la vaina, los OLs mantienen la vaina descompactada para favorecer la entrada de metabolitos que alimenten la lengua interna. Gradualmente, la mielina se va compactando y creando los internodos. Los segmentos axonales sin mielinizar se denominan nodos de Ranvier, y contienen los

canales de sodio responsables de impulsar la conducción saltatoria (Saab & Nave, 2017; Simons & Trotter, 2007).

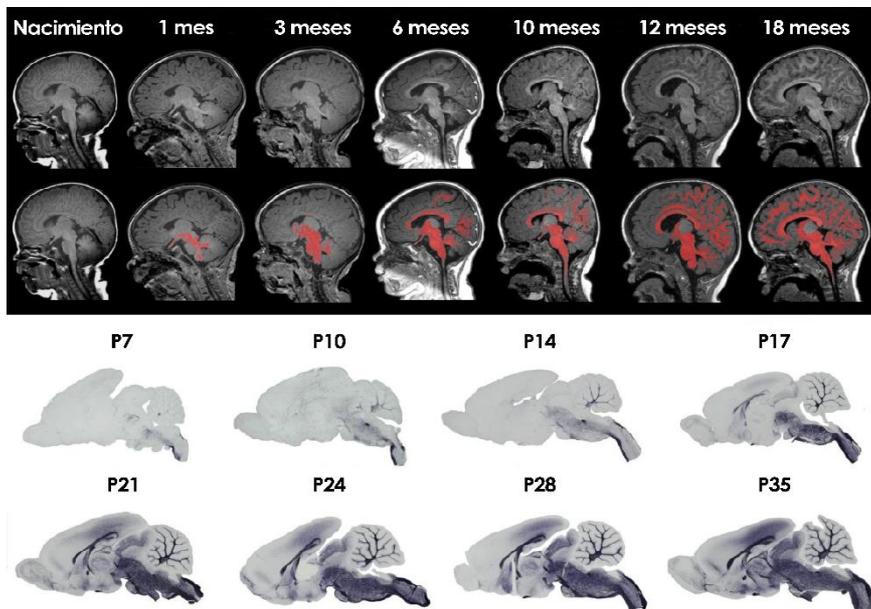
Durante este proceso se activa la maquinaria para sintetizar y transportar los lípidos y proteínas específicas de la mielina. Primero se sintetizan Los componentes lipídicos estructurales, GalC y fosfolípidos, y posteriormente se expresan PLP y MBP, proteínas requeridas para la compactación de la vaina (Ozgen et al., 2016a).



Esquema 8. Formación de la vaina de mielina. Representación esquemática de la síntesis de la vaina de mielina. (Elaboración propia. App Biorender).

El **Esquema 9** muestra la temporalización de la mielinización y la comparativa entre humano y ratón. Los patrones de mielinización muestran un alto grado de similitud entre ambas especies. La mayor parte de la mielinización tiene lugar durante el primer año de vida, sin embargo, la sustancia blanca sigue creciendo hasta aproximadamente los 40 años en el caso del humano (Ozgen et al., 2016a; Stassart et al., 2018; van Tilborg et al., 2018). Del mismo modo, en los ratones la mielinización puede extenderse hasta los 60 días de vida postnatal (Barateiro & Fernandes, 2014a). En ambos casos, el proceso sigue la dinámica de formación en dirección caudal a rostral, es decir, primero mieliniza la médula espinal hasta terminar en la corteza prefrontal (Ozgen et al., 2016; Stassart et al., 2018a). Las distintas proyecciones axonales tienen diferentes perfiles de mielinización en distintas capas cerebrales. Existe un gradiente de mielina con mayor mielinización en las capas V y VI en relación con las capas II y III (Bercury & Macklin, 2015).

El mantenimiento de la mielina es un proceso activo e independiente de la renovación celular. La mayoría de los OLs se forman durante los primeros 5 años de vida, y el 0.3% se recambia cada año. En el caso de los ratones, los OLs del cuerpo calloso son capaces de sobrevivir hasta 20 meses (Tripathi et al., 2017). Por tanto, la continua síntesis de mielina es necesaria para mantener la integridad axonal.



Esquema 9. Temporalización de la mielinización. Comparativa de la formación de la mielina entre humano y ratón (Modificado de van Tilborg et al., 2018).

Las proteínas específicas de la vaina presentan un alto grado de estabilidad, con una tasa de cambio relativamente baja, aproximadamente de 11 semanas para MBP y 6 meses para PLP. Por el contrario, los lípidos experimentan un recambio mucho más rápido y dinámico, del orden de entre 20-90 días para los fosfolípidos. El colesterol es la molécula lipídica más estable de la vaina, teniendo una duración de 359 días (Barnes-Vélez et al., 2023).

2.2.4. Regulación de la mielinización

La interacción entre el axón y el oligodendrocito es necesaria para activar la maquinaria de síntesis y el transporte de los componentes de la vaina de mielina. El diámetro del axón es un factor limitante, dado que sólo los axones mayores de 0.2 μm son mielinizables. Hay que destacar, que la actividad neuronal estimula la mielinización a través de la activación de diferentes vías de señalización, entre ellas, Notch y BDNF (Brain-derived neurotrophic factor). Además, el glutamato y la liberación de vesículas sinápticas inducen la diferenciación de los OPCs (apartado 2.1.3), reflejando la plasticidad de la mielina alimentada por la actividad sináptica. Sin embargo, determinados estímulos endógenos de los OLs son necesarios e independientes de la influencia neuronal (Nave, 2010; Simons & Trotter, 2007).

El factor regulador de la mielina (Myrf) es el coordinador endógeno por excelencia de la mielinización. Su expresión, inducida durante el inicio de la diferenciación, es necesaria para la iniciación y mantenimiento del proceso (Emery & Lu, 2015). Este factor de transcripción activa directamente genes implicados en la diferenciación, remodelado citoesquelético, metabolismo lipídico y proteínas específicas de mielina (Cristobal & Lee, 2022). No obstante, estas funciones son exclusivas del SNC, dado que Myrf no está implicado en la mielinización del sistema nervioso periférico (Emery & Lu, 2015). El factor regulador del gen de la mielina (MRF) también es necesario para la inducción de genes pro-mielizantes, aunque no participa en la diferenciación de los OLs (Emery et al., 2009).

La remodelación del citoesqueleto es crucial para la formación de la mielina. Los cambios en la estructura y dinámica de la actina están regulados por cascadas de señalización y estímulos extracelulares. La familia de las RhoA/Rock median el movimiento y los cambios morfogénicos celulares (Thomason et al., 2020). Por ejemplo, la

activación de RhoA y la acumulación de Rock2 bloquean la mielinización (Muñoz-Esquivel et al., 2019).

2.3. Papel del metabolismo lipídico en la mielinización

El metabolismo lipídico juega un papel importante durante la mielinización. Trastornos como la enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher, la enfermedad de Krabbe y las leucodistrofias están causados por mutaciones en genes que codifican proteínas implicadas en el metabolismo de los lípidos de la mielina, lo que conduce a una formación aberrante de la vaina y a disfunciones neurológicas (Duncan & Radcliff, 2016).

2.3.1. Factores de transcripción

Los factores de transcripción desempeñan un papel clave en la síntesis de los ácidos grasos. Se ha demostrado que la activación de varios factores de transcripción, entre ellos PPAR y SREBP (proteínas de unión al elemento regulador de esteroides) inducen la formación de la mielina modulando el metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol (Bergles et al., 2019; Monnerie et al., 2017).

2.3.2. Colesterol

La biosíntesis *de novo* del colesterol es esencial para la formación de la mielina. Varios estudios demuestran que la alteración de enzimas relacionadas con la síntesis de colesterol, como son FDFT1 o HMG-CoA, inhiben la formación de la vaina dando lugar a hipomielinización (Barnes-Vélez et al., 2023a; Mathews et al., 2014). Es más, mutaciones en los transportadores del colesterol manifestaron las mismas consecuencias, enfatizando que no sólo la síntesis endógena del colesterol es importante, sino que los oligodendrocitos no son capaces de compensar los efectos mediante la importación de esteroides externos (Naffaa et al., 2022).

2.3.3. Galactocerebrósidos

Los galactolípidos poseen cadenas lateras largas saturadas y la longitud de estos ácidos grasos condiciona el mantenimiento de la mielina. La sobreexpresión de GalC, involucrada en la patogénesis de la enfermedad de Krabbe, causa la apoptosis de los OLs, influyendo directamente en la actividad sináptica (Duncan & Radcliff, 2016). Además, la inhibición de la biosíntesis de GalC en ratones provoca la inestabilidad estructural de la vaina, *axon swelling* y alteraciones en los canales de sodio (Ozgen et al., 2016a). Por tanto, estos estudios demuestran que GalC es necesaria para la estabilización de la mielina, y su sobreexpresión influye directamente en la disfunción y supervivencia neuronal (Barnes-Vélez et al., 2023a).

2.3.4. Esfingomielinas

El metabolismo de los esfingolípidos interviene en gran variedad de procesos biológicos. Los esfingolípidos bioactivos, como son la ceramidas, esfingosina y esfingosina-1-fosfato (S1P), participan en los procesos de especificación celular, crecimiento celular y apoptosis, mientras que los esfingolípidos complejos, entre ellos la esfingomielina, son esenciales para la estructura de la vaina y su organización funcional (Guarnieri et al., 2018).

Los niveles de ceramidas aumentan a medida que progresa la mielinización, ya que son los precursores para la síntesis de cerebrósidos y esfingomielinas (Davis et al., 2020a). No obstante, la acumulación de ceramidas, principal característica de la enfermedad de Farbers, causa retraso del crecimiento, ventriculomegalia acompañada de hidrocefalia, y agenesia del cuerpo calloso (Sikora et al., 2017). Del mismo modo, niveles excesivamente altos de esfingosina inducen la muerte de los OLs y desmielinización (Davis et al., 2020a).

2.3.5. Transportadores lipídicos

Los fosfolípidos de la mielina derivan de la biosíntesis *de novo* dentro del SNC. Sin embargo, determinados ácidos grasos esenciales, como el ácido docosahexaenoico (DHA) necesitan ser importados desde la periferia a través de transportadores. Recientemente, se ha descrito que el transportador del DHA, Mfsd2a (dominio 2a de la superfamilia de facilitadores principales), está implicado en la regulación de los fosfolípidos de grasos ácidos poliinsaturados, previniendo la aparición de microcefalia e hipomielinización (Sengottuvel et al., 2023a).

3. COMPLEJO PROMOTOR DE LA ANAFASE / CICLOSOMA (APC/C) EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

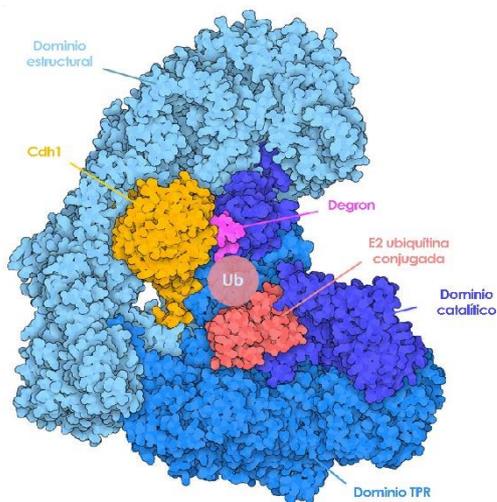
El complejo promotor de la anafase/ciclosoma (APC/C, *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) es un complejo multiprotéico con actividades reguladoras y catalíticas (Watson et al., 2019). APC/C es una E3 Ubiquitina ligasa cuya función es regular el ciclo celular desde la mitad de la mitosis hasta el final de la fase G1 (Bansal & Tiwari, 2019; Sivakumar & Gorbsky, 2015). El complejo marca proteínas mediante poliubiquitinación, para que éstas sean degradadas por el proteasoma (A. Almeida, 2012a; Yamano, 2019).

Los principales sustratos del complejo son proteínas mitóticas y, por tanto, regula procesos del ciclo celular responsables de la segregación de la cromatina durante la anafase, salida de la mitosis y el establecimiento y mantenimiento de la fase G1 (Eguren et al., 2011). Sin embargo, APC/C desempeña numerosas funciones fuera del ciclo celular, especialmente en el SNC, como son la regulación del metabolismo glucídico (Bolaños et al., 2010; Herrero-Mendez et al., 2009), estabilidad genómica (García-Higuera et al., 2008), neurogénesis y diferenciación neuronal (Delgado-Esteban et al., 2013), supervivencia

neuronal (Almeida et al., 2005), sinaptogénesis (J. Huang & Bonni, 2016a), y procesos de aprendizaje y memoria (Bobo-Jiménez et al., 2017).

3.1. Estructura de APC/C y reconocimiento de sustratos

APC/C es una *cullin RING-finger* E3 Ubiquitina ligasa multimérica formada por 14 subunidades, distribuidas en tres módulos: brazo catalítico, dominio estructural (*Platform*) y *Tetratricopeptide Repeat* o TPR (Lapresa, Agulla, Bolaños, et al., 2022a; Schrock et al., 2020) (**Esquema 10**). El módulo catalítico está formado por Apc2, Apc10 y Apc11. La subunidad APC11 interactúa con la E2 Ubiquitina a través del dominio *RING-finger*, permitiendo la transferencia de una ubiquitina del sitio activo E2 a la lisina de la proteína diana, mientras que Apc2, estabiliza la unión de APC11 y la enzima interactuando con su dominio *cullin* (Schrock et al., 2020). Apc10, junto con los cofactores Cdc20 y Cdh1, participan de manera directa en el reconocimiento de sustratos (Eme et al., 2011).



Esquema 10. Arquitectura molecular de APC/C-Cdh1. El complejo APC/C adopta una forma triangular delineada por una coraza en forma de celosía. Se pueden observar los tres principales dominios, estructural, TPR y catalítico que, junto con el cofactor Cdh1, marcan proteínas para su posterior degradación en el proteasoma. Adaptado de PDB

Las subunidades Apc3 (*cdc27*), Apc6 (*cdc16*), Apc7 y Apc8 (*cdc23*), se caracterizan por presentar el dominio TPR, que consiste en la repetición de una secuencia de 34 aminoácidos, que le permite coordinar la interacción entre proteínas (Peters, 2006a). El resto de subunidades, Apc1, Apc4 y Apc5, funcionan como andamios

moleculares que coordinan las uniones moleculares de los módulos catalíticos y de reconocimiento de degrones, aunque no se descartan papeles directos en las interacciones con el sustrato y/o la E2 Ubiquitina (Chang et al., 2014a).

La activación de APC/C requiere la unión temporal y secuencial de Cdc20 o Cdh1 (Lapresa et al., 2022). Ambas proteínas coactivadoras poseen dominios WD40 en la región C-terminal que reclutan sustratos de APC/C y aumentan la actividad específica del complejo promoviendo su interacción con las enzimas E2 UbcH10 y UBE2S (Watson et al., 2019; Zhou et al., 2016). El complejo APC/C reconoce sus sustratos a través de motivos de destrucción cortos o degrones. Ambos cofactores reconocen los degrones D-box (RxxLx[D/E][Ø]xN[N/S] y ABBA (Fx[ILV][FY]x[DE]), mientras que, además, Cdh1 es capaz de reconocer KEN-box (KENxxx[N/D/E] (Lapresa, Agulla, Bolaños, et al., 2022b). Posteriormente, se describieron degrones no canónicos derivados de modificaciones en los motivos D-box y KEN-box. Sin embargo, no todas las proteínas que contienen estos degrones en su secuencia son degradadas por el complejo, dado que el degrón debe estar disponible para ser reconocido por la ligasa (Davey & Morgan, 2016).

3.2. Funciones de APC/C-Cdh1 en el sistema nervioso central

Durante el desarrollo y el mantenimiento del SNC, se requiere un equilibrio preciso entre la síntesis y la degradación de las proteínas reguladoras de los procesos esenciales (Kurshan & Shen, 2019). Hasta el momento, se han descrito importantes funciones de APC/C-Cdh1 en procesos fundamentales del SNC, tanto durante el desarrollo como en la etapa adulta. Entre estas funciones, destacan el control del crecimiento axonal (Lasorella et al., 2006a), la neurogénesis y la diferenciación (Delgado-Esteban et al., 2013; Rodríguez et al., 2019), la supervivencia neuronal (Almeida et al., 2005), la sinaptogénesis y los procesos de aprendizaje y memoria (Bobo-Jiménez et al., 2017), el metabolismo

glucídico (Fernandez-Fernandez et al., 2012; Herrero-Mendez et al., 2009), así como la modulación de procesos neurodegenerativos (Lapresa et al., 2022). Además, APC/C-Cdh1 está involucrado en procesos patológicos, como es la isquemia y toxicidad del β -amiloide, como describimos más adelante (Fuchsberger et al., 2016; Lapresa, Agulla, Gonzalez-Guerrero, et al., 2022a; Maestre et al., 2008; Veas-Pérez De Tudela et al., 2015).

3.2.1. Neurogénesis y diferenciación neuronal

La neurogénesis es un proceso vital para el desarrollo del sistema nervioso, por el cual se generan nuevas neuronas a partir de las NPCs. Al inicio de la corticogénesis, la glía radial amplía su reserva mediante divisiones proliferativas y, a medida que avanza la corticogénesis, sufre divisiones asimétricas para generar neuronas directa o indirectamente mediante la producción de progenitores intermedios que se dividen para generar pares de neuronas (Agirman et al., 2017a). La neurogénesis, de manera global, es un proceso altamente complejo que involucra diferentes etapas: proliferación de las células pluripotenciales, migración, diferenciación, supervivencia de las nuevas neuronas y la integración de éstas en los circuitos neuronales existentes (Götz & Huttner, 2005).

Estudios iniciales de nuestro grupo revelaron que APC/C-Cdh1 regula la diferenciación neuronal, ya que promueve la salida del ciclo celular de los NPCs e induce su diferenciación. Así, Cdh1 es esencial para la diferenciación neuronal inducida por ácido retinoico en células de neuroblastoma humano SHSY5Y. Este trabajo confirmó que el ácido retinoico promueve la acumulación de Cdh1 en el núcleo, y que, además, reduce el nivel de ARNm de la proteína Rae1, inhibidor de la actividad de APC/C-Cdh1. En consecuencia, se facilita la diferenciación de células de neuroblastoma en células de fenotipo neuronal (Cuende et al., 2008).

Posteriormente, se demostró que el complejo está implicado en la neurogénesis y en la coordinación del tamaño de la corteza (Delgado-

Esteban et al., 2013a; Eguren et al., 2013a). Hay que tener en cuenta, que la morfología del cerebro adulto es la consecuencia de un estricto balance entre la proliferación de los progenitores y el comienzo de la neurogénesis en la etapa embrionaria. Al comienzo del desarrollo de la corteza, los progenitores se dividen simétricamente para mantener su población. Sin embargo, en estadios posteriores estas células progenitoras se dividen de manera asimétrica, formando neuronas diferenciadas (Agirman et al., 2017).

La duración del ciclo celular es un elemento esencial en el control del balance entre el mantenimiento de las células progenitoras y la diferenciación de las neuronas. En este sentido, la actividad de APC/C-Cdh1 juega un papel fundamental, no sólo en la diferenciación de las neuronas de un modelo *in vitro*, sino también en la propia neurogénesis *in vivo*. Delgado-Esteban y colaboradores demostraron que la ausencia de Cdh1 en ratón, reprime la neurogénesis, ya que rompe el balance entre la salida de ciclo de los progenitores y el inicio de la diferenciación neuronal. La falta de Cdh1 promueve una disminución de la fase G1 y un aumento de la fase S, provocando estrés replicativo y muerte por apoptosis de los NPCs. El resultado es el descenso del número de neuronas corticales generadas y, en consecuencia, del tamaño de la corteza cerebral, señalando a Cdh1 como elemento clave en los procesos de diferenciación neuronal y neurogénesis (Delgado-Esteban et al., 2013a).

Trabajos recientes del grupo han identificado una nueva mutación humana de Cdh1 (p.Asp187Gly). El cambio en la secuencia de un aspartato por una glicina induce una disminución de los niveles proteicos del cofactor y, consecuentemente, la inactivación del complejo, dando lugar a importantes alteraciones encefálicas, como son la microcefalia prenatal, retraso psicomotor severo y epilepsia refractaria (Rodríguez et al., 2019a). Experimentalmente, demostraron que la mutación de Cdh1 causa la muerte de los NPCs por apoptosis, lo que disminuye la neurogénesis, alterando así la estructura y funcionalidad del cerebro.

Posteriormente, se han identificado otras dos mutaciones en Cdh1 que causan discapacidad intelectual y epilepsia (Manivannan et al., 2022). Todo ello evidencia la importancia de Cdh1 en el desarrollo del SNC en humanos.

3.2.2. Muerte y Supervivencia neuronal

Las regiones neurogénicas del cerebro de los mamíferos generan neuronas que acabarán sobreviviendo y alcanzando una fase madura. La muerte celular afecta tanto a las neuronas inmaduras producidas durante el desarrollo embrionario, como a las que se generan en regiones neurogénicas adultas. La eliminación de un número considerable de neuronas que aún no están completamente integradas en los circuitos locales contribuye a garantizar que la maduración y la función homeostática de las redes neuronales del cerebro se desarrollen correctamente. Las señales externas procedentes del microentorno cerebral, junto con las vías de señalización intrínsecas, determinan si una neurona concreta va a morir. Para adaptar esta señalización, las neuronas expresan una serie de factores, así como de moléculas, que regularán la decisión de supervivencia o muerte celular (Pfisterer & Khodosevich, 2017).

APC/C-Cdh1 juega un papel fundamental en la supervivencia de las neuronas. La activación del ciclo celular en las neuronas postmitóticas induce la apoptosis en lugar de la proliferación (Pandey & Vinod, 2022). Cdh1 es el principal activador de APC/C en las neuronas postmitóticas, previniendo la reentrada de las células en el ciclo celular y la muerte neuronal. La ciclina B1, regulador del ciclo celular, se encuentra elevada en zonas dañadas de cerebros post-mortem con enfermedad de Alzheimer (EA) (McShea et al., 2007). La falta de Cdh1 promueve la acumulación de la ciclina B1, conocido sustrato de APC/C-Cdh1, lo que, a su vez, induce la entrada aberrante de las neuronas en la fase S y la consecuente muerte neuronal (Almeida et al., 2005).

Es más, APC/C-Cdh1 tiene una función clave en la excitotoxicidad (muerte neuronal por sobre-estimulación de los receptores de glutamato), que ocurre en las enfermedades neurodegenerativas, como es EA, y la isquemia cerebral. Estudios previos del laboratorio demostraron que, en condiciones excitotóxicas, se induce la fosforilación de Cdh1, lo que conduce a la inactivación de APC/C. La estimulación de los receptores de glutamato (GluRs) activa Cdk5 (Cyclin-dependent kinase 5), dependiente de Ca^{2+} , que fosforila Cdh1, lo que promueve su traslocación al citosol e impide su unión a la ligasa, provocando la inactivación de APC/C. Como consecuencia, la ciclina B1 se acumula en el núcleo (Maestre et al., 2008) y en la mitocondria (Veas-Pérez de Tudela et al., 2015) provocando, por un lado la entrada aberrante de las neuronas en la fase S (Maestre et al., 2008) y, por otro, daño mitocondrial y estrés oxidativo (Veas-Pérez de Tudela et al., 2015). El resultado es la muerte neuronal por apoptosis, lo que pone de manifiesto la importancia de Cdh1 en la isquemia [Almeida, 2012]. La entrada aberrante de las neuronas en la fase S se produce a través de la activación de la vía ciclina D1-Cdk4-pRb (Veas-Pérez De Tudela et al., 2015). En la mitocondria, la acumulación de ciclina B1 es capaz de activar Cdk1 (Cyclin-dependent kinase 1) en neuronas, localizada en la membrana mitocondrial interna. El complejo ciclina B1-Cdk1 es capaz de fosforilar la proteína antiapoptótica Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large), que impide su unión a la ATPsintasa mitocondrial y, con ello, previene su activación. Como consecuencia, se altera el transporte de electrones de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, lo que desencadena la generación de especies reactivas de oxígeno, disfunción mitocondrial y, finalmente, apoptosis (Veas-Pérez de Tudela et al., 2015). Por lo tanto, la ciclina B1 promueve la entrada de las neuronas al ciclo celular, disfunción mitocondrial y estrés oxidativo, para inducir finalmente muerte neuronal por apoptosis (Lapresa et al., 2022).

Otra diana molecular importante de Cdh1 es Rock2 (Rho-associated protein kinase 2), quinasa implicada en la estabilidad dendrítica. APC/C-Cdh1 degrada Rock2 y, con ello, permite la plasticidad neuronal y

supervivencia de las neuronas en el cerebro adulto. La falta de Cdh1 en neuronas glutamatérgica de cerebro adulto provoca la acumulación de Rock2 en la corteza cerebral y el hipocampo, lo que promueve la disrupción dendrítica, pérdida sináptica y déficits en el aprendizaje y memoria. La administración de un fármaco clínicamente probado, que es inhibidor específico de Rock2, Fasudil, rescata la pérdida neuronal y la disfunción cognitiva en el ratón carente de Cdh1, lo que demuestra que APC/C-Cdh1 regula la integridad dendrítica y el funcionamiento del cerebro adulto (Bobo-Jiménez et al., 2017).

Durante los estadios iniciales de la EA, Rock2 se acumula en el cerebro y aumenta a medida que progresa la enfermedad (Herskowitz et al., 2013). El tratamiento de neuronas corticales con oligómeros del fragmento amiloidogénico A β 25-35 activa Cdk5, que fosforila Cdh1 e inactiva APC/C, provocando la estabilización y acumulación de Rock2, y con ello, la neurodegeneración. La prevención de la muerte neuronal inducida por el A β 25-35 mediante la expresión de una forma fosfodeficiente de Cdh1 y la inhibición farmacológica de Rock2, manifestó la relevancia de la vía Cdk5-Rock2 y su contribución a los mecanismos de neurodegeneración (Lapresa et al., 2022). Se ha identificado a la glutaminasa como sustrato diana de APC/C-Cdh1 en neuronas, con una función patogénica en la EA. Así, la inactivación de APC/C-Cdh1 en un modelo experimental de EA in vivo, causa la acumulación de glutaminasa, que potencia la excitotoxicidad por acumulación de glutamato y, con ello, la neurodegeneración asociada a la EA (Fuchsberger et al., 2016). Por tanto, APC/C-Cdh1 desempeña un importante papel en los procesos neurodegenerativos.

3.2.3. Crecimiento axonal

En el sistema nervioso en desarrollo, Id2 aumenta la proliferación celular, favorece la progresión tumoral e inhibe la actividad de los factores de transcripción neurogénicos básicos hélice-bucle-hélice (bHLH) (Lavarone & Lasorella, 2004). Id2 y otros miembros de la familia de

proteínas Id son muy inestables y se eliminan con facilidad cuando las células entran en estado quiescente. En este sentido, APC/C-Cdh1 se une a Id2 para su ubiquitinación y posterior degradación, a través de un motivo D-Box. La degradación de Id2 neuronal permite la acumulación del receptor Nogo, vinculando así la actividad de APC/CCdh1 con los genes diana de bHLH para la inhibición del crecimiento axonal. Así, la ausencia de Cdh1 estabiliza Id2 en las neuronas, potenciando el crecimiento axonal de las neuronas (Lasorella et al., 2006a).

3.2.4. Sinaptogénesis y dendritogénesis

La sinaptogénesis es un proceso complejo, espacial y temporalmente regulado, que comienza con la formación y crecimiento de las neuritas, las cuales se diferencian bien a axones o a dendritas. Los axones crecen con la finalidad de encontrar dendritas diana con las que establecer una conexión y, de la misma manera, las dendritas se estabilizan para dar lugar a la correspondiente diana que permita la formación de sinapsis. Posteriormente, se establece el contacto entre los terminales presinápticos axónicos y los terminales postsinápticos dendríticos. Finalmente, se produce un periodo de pérdida de sinapsis denominado *pruning* o poda sináptica que conlleva a la redefinición y a la estabilización de los circuitos de la red neuronal (Wefelmeyer et al., 2016).

Se han descrito funciones presinápticas y postsinápticas de APC/C-Cdh1. Individuos con ausencia de la subunidad Apc2, presentan un tamaño sináptico mayor, que se atribuye al incremento de la cantidad de botones sinápticos. El complejo se encarga de ubiquitinar a la Liprina- α , que controla el número de botones sinápticos. Por todo ello, APC/C-Cdh1 posee una función presináptica, ya que es capaz de restringir el número de botones sinápticos y, además, una función postsináptica, porque restringe la abundancia de receptores de glutamato, siendo esencial en el desarrollo y funcionamiento de las sinapsis (Van Roessel et al., 2004).

Por otro lado, la correcta formación y el mantenimiento de la red dendrítica es esencial para el funcionamiento neuronal. La estabilidad dendrítica confiere a las neuronas la capacidad de mantener la integridad de su red, de tal manera que la pérdida de estabilidad dendrítica se asocia con trastornos psiquiátricos y enfermedades neurodegenerativas. La alteración dendrítica y la pérdida de espinas dendríticas y sinapsis ocurre en situaciones patológicas, como son la esquizofrenia y la depresión, así como en enfermedades neurodegenerativas (Koleske, 2013). La proteína Rock, efector de la GTPasa RhoA, es un regulador esencial del citoesqueleto de los microtúbulos de las neuronas. Se sabe que Rock modifica el número, la morfología y la dendritas en varios tipos de neuronas. La sobreactivación de la señalización de Rock estabiliza el citoesqueleto de la actina y, con ello, previene la plasticidad sináptica, mientras que la inhibición de Rock promueve el ensamblaje de microtúbulos y restaura la complejidad y plasticidad de las dendritas (Chen & Firestein, 2007; Nakayama et al., 1995).

La ausencia de Cdh1 altera la arborización de las dendritas y provoca la pérdida de espinas dendríticas y sinapsis en la corteza y el hipocampo, que, a su vez, produce deterioro cognitivo y neurodegeneración en ratones adultos. Rock2 es un sustrato de APC/C-Cdh1, y ante la ausencia del cofactor, la actividad de Rock2 aumenta en la corteza y el hipocampo. La inhibición de la actividad de Rock2, mediante el tratamiento con fasudil, previene la desintegración de la red dendrítica, la pérdida de memoria y la neurodegeneración. Por tanto, APC/C-Cdh1 es esencial para el mantenimiento de la red dendrítica y plasticidad sináptica mediante la regulación de los niveles y actividad de Rock2 (Bobo-Jiménez et al., 2017).

3.2.5. Plasticidad sináptica

La plasticidad sináptica desempeña un papel fundamental en las respuestas adaptativas del sistema nervioso a la experiencia y aprendizaje. Las dos formas principales de plasticidad sináptica son, la

potenciación a largo plazo (LTP) y la depresión a largo plazo (LTD), los cuales pueden representar procesos fisiológicos del aprendizaje y la memoria (Mulkey & Malenka, 1992). La plasticidad sináptica se ve afectada en distintas enfermedades neurológicas, incluidos los trastornos del desarrollo cognitivo. En particular, las alteraciones de la LTD están relacionadas con el síndrome del X frágil, que es la causa monogénica conocida más común de discapacidad intelectual y del trastorno del espectro autista, causada por la alteración de los niveles de expresión de su proteína FMRP (Bassell & Warren, 2008).

Los principales sustratos de FMRP son proteínas sinápticas cruciales para la neurotransmisión, incluyendo PSD-95 (Postsynaptic Density-95) y algunas de las denominadas proteínas asociadas a microtúbulos (MAP). Por ello, esta proteínas desempeña un papel trascendental en el desarrollo neuronal, en la plasticidad sináptica y en la maduración de las conexiones, a través del control de síntesis de proteínas (Kazdoba et al., 2014).

La pérdida de FMRP desencadena el incremento de una forma de LTD inducida por la activación de receptores de glutamato metabotrópicos (mGluR). Por otro lado, la activación de estos receptores desencadena la degradación de FMRP, sugiriendo que la señalización FMRP y mGluR tienen una relación mutuamente opuesta. Hay que destacar que APC/C-Cdh1 también controla la plasticidad en las neuronas del cerebro anterior y la LTP de fase tardía en el hipocampo. Así, un ratón deficiente de Cdh1 en el cerebro anterior, pierde la inducción de mGluR-LTD, pero no del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDAR)-LTD, en las sinapsis de la capa CA1 del hipocampo. APC/C-Cdh1 interactúa con FMRP, a través del degrón D-box. La falta de Cdh1 impide la ubiquitinación inducida por mGluR y la degradación de FMRP en el hipocampo. En análisis epistáticos en ratones, el KO de FMRP suprime el fenotipo inducido por el KO condicional de Cdh1, identificando así a FMRP como un nuevo sustrato del complejo y señalando el papel esencial de APC/C-Cdh1 en la regulación de la

plasticidad sináptica a través de la inducción de mGluR-LTD (Huang et al., 2015).

3.2.6. Metabolismo glucídico

La disfunción mitocondrial y el estrés oxidativo son característicos de las enfermedades neurodegenerativas (Dewanjee et al., 2022). Las neuronas dependen de la fosforilación oxidativa para la generación de energía necesaria para la transmisión sináptica. Además, son muy sensibles a altos niveles de especies reactivas de oxígeno (Bonvento & Bolaños, 2021a). De hecho, las neuronas metabolizan activamente la glucosa, a través de la vía de las pentosas fosfato para mantener el estrés oxidativo reducido y asegurar la supervivencia neuronal (Fernandez-Fernandez et al., 2012). Por ello, necesitan tener una actividad glucolítica baja que les permita mantener su homeostasis redox. APC/C-Cdh1 modula la glucólisis, a través de la regulación de los niveles proteicos de la 6-fosfofructosa-2-kinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFKFB3). Esta enzima sintetiza fructosa-2,6-bisfosfatasa, que es un activador alostérico de la PFK1 y, con ello, regula el flujo glucolítico. La pérdida de Cdh1 estabiliza PFKFB3 induciendo un cambio metabólico en el que aumenta la glucólisis en detrimento de la vía de las pentosas fosfato, provocando estrés oxidativo, daño mitocondrial y la muerte neuronal (Herrero-Mendez et al., 2009). Además, la activación del APC/C-Cdh1 inhibe el proceso glucolítico y la proliferación celular, lo que evidencia la función de Cdh1 en el acoplamiento entre metabolismo y proliferación (Almeida et al., 2010; Bolaños et al., 2010). Recientemente, Liu y colaboradores han demostrado que el lactato puede formar un complejo con la cisteína proteasa SENP1 y estabilizar la SUMOilación de Apc4, dando lugar a la reorientación de APC/C. Esta remodelación estimula la degradación de proteínas que regulan la salida del ciclo celular, entre ellas la ciclina B1 y la securina (Liu et al., 2023).

Metabólicamente hablando, los oligodendrocitos son parecidos a las neuronas. Los niveles proteicos de PFKFB3 en estas células son bajos

(Meyer & Rinholm, 2021) con el fin de minimizar el estrés oxidativo y evitar la peroxidación de los lípidos de la mielina (Lambhate et al., 2021). Por el contrario, los astrocitos presentan una alta capacidad glucolítica y son capaces de sobrevivir en condiciones de estrés oxidativo (Bonvento & Bolaños, 2021).

3.3. Regulación de APC/C-Cdh1 en el sistema nervioso central

Cdh1 es el principal activador de APC/C en el cerebro. La regulación de APC/C-Cdh1 es compleja y multifactorial, incluyendo modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, sumoilaciones y acetilaciones), cambios de localización celular, proteínas activadoras e inhibitorias y la propia autodegradación de Cdh1 (Lapresa et al., 2022; Zhou et al., 2016). Mayoritariamente, Cdh1 se encuentra desfosforilado en el núcleo, donde se une a las subunidades catalíticas del complejo y activa APC/C. La quinasa Cdk5 fosforila Cdh1 en las neuronas (Maestre et al., 2008). Así, la fosforilación de Cdh1 bloquea su interacción con el complejo, promoviendo la traslocación del cofactor al citoplasma y la inactivación de APC/C (Maestre et al., 2008; Veas-Pérez De Tudela et al., 2015).

Además, la estabilidad de Cdh1 está autorregulada por el propio APC/C-Cdh1, vía ubiquitinación y degradación proteasomal (Veas-Pérez De Tudela et al., 2015). La fosforilación de Cdh1, a su vez, desencadena un bucle positivo de la inhibición de APC/C, promoviendo la acumulación y estabilización de Cdh1 inactivado en el citosol (Veas-Pérez De Tudela et al., 2015). La localización nuclear de Cdh1 induce la desestabilización de la proteína mediada por la E3 ubiquitina ligasa Skp1 Cullin1 F-Box (SCF) (Listovsky et al., 2004; Nagai et al., 2018). Así, la mutación Asp187Gly en Cdh1 confina la proteína en el núcleo, donde es ubiquitilada por SCF, lo que explica la mayor inestabilidad del Cdh1 mutado (Rodríguez et al., 2019a).

Además de la regulación por fosforilación y localización, existen inhibidores de APC/C-Cdh1. La proteína Emi1, que contiene una D-box

en su secuencia, se une al complejo secuestrándolo e impidiendo su asociación con otros sustratos de Cdh1 (Cappell et al., 2018). Sin embargo, este mecanismo no se ha demostrado aún en neuronas.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS

APC/C-Cdh1 desempeña una función esencial en el desarrollo del sistema nervioso, donde coordina la salida de los progenitores neurales del ciclo celular y el inicio de la neurogénesis y, con ello, el tamaño del encéfalo y organización de la corteza cerebral. Recientemente, hemos identificado una nueva mutación de Cdh1 (Asp187Gly) que causa pérdida de actividad de APC/C-Cdh1 y provoca microcefalia, retraso psicomotor y epilepsia en humanos. Estos trastornos están asociados tanto con alteraciones en la neurogénesis, como en la oligodendrogénesis y mielinización. Es más, un examen preliminar imagenológico del encéfalo del paciente que portaba la mutación de Cdh1 mostró una disminución de la sustancia blanca y disgénesis del cuerpo calloso. Por todo ello, creemos que APC/C-Cdh1 podría desempeñar un papel clave en la oligodendrogénesis y la mielinización durante el desarrollo postnatal.

2. OBJETIVOS

Nuestro objetivo general se ha centrado en investigar la función de APC/C-Cdh1 sobre la oligodendrogénesis y mielinización postnatal en el sistema nervioso central.

En concreto, nuestros objetivos específicos han sido:

1. Establecer un modelo deficiente de Cdh1 en el sistema nervioso central que permita evaluar los cambios estructurales y morfológicos en el encéfalo durante la etapa postnatal.
2. Investigar la función de APC/C-Cdh1 en la oligodendrogénesis y mielinización postnatal en el sistema nervioso central.
3. Estudiar el efecto de la ausencia de Cdh1 en las células nerviosas sobre la formación de la vaina de mielina y el metabolismo lipídico cerebral.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTACIÓN ANIMAL PROCEDIMIENTOS Y MODELO DE INVESTIGACIÓN

Todos los procedimientos realizados con animales cumplen la vigente Directiva 2010/63/EU y 2007/526/CE de la Comisión Europea relativa a las directrices sobre alojamiento y cuidado de los animales, basadas firmemente en el principio de las Tres Rs, para reducir, reutilizar y refinar el uso de animales empleados con fines científicos, así como la legislación española vigente RD53/2013 y ECC/566/2015, donde se establecen las normas básicas aplicables para la protección de animales empleados con fines científicos, incluyendo la formación y docencia. Dichos procedimientos han sido previamente aprobados por el Comité de Bioética para la experimentación animal y humana del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca.

Los animales se criaron en jaulas individuales en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca, manteniendo un ciclo no invertido de luz-oscuridad de 12h, entre las 20:00 y las 8:00 horas del día siguiente, humedad relativa ambiente de 45-65% y temperatura de entre 20-25°C. Los animales se alimentaron *ad libitum* con una dieta sólida estándar (LabDiet® Picolab® Verified-751F) y libre acceso al agua de bebida.

1.1. Modelo experimental

Para el desarrollo de la presente tesis doctoral, se ha empleado un modelo de ratón *knockout* condicional (cKO) deficiente en *Cdh1* bajo el promotor de la *nestina*. Al utilizar este promotor se elimina la expresión del cofactor *Cdh1* durante las etapas tardías del desarrollo embrionario (Liang et al., 2012). Así, el modelo experimental establecido, permite analizar qué impacto podría estar ejerciendo *Cdh1* en procesos esenciales en el desarrollo del sistema nervioso central, como son la oligodendrogénesis y la mielinización.

Los ratones transgénicos se generaron vía el sistema de recombinación Cre/LoxP. Para ello, se cruzaron dos estirpes de ratones transgénicos. La primera estirpe contiene los exones 2 y 3 del gen *Fzr1* flanqueados por secuencias *Locus of X-Over P1* (LoxP). Estos animales fueron cedidos por los doctores Irene García Higuera, Marcos Malumbres y Sergio Moreno, y generados en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas. Originalmente, el fondo genético de estos animales estaba compuesto por tres cepas de distinta contribución: C57BL/6J, 129/SV y CD1. Con el objetivo final de homogenizar el fondo genético, se llevaron a cabo sucesivos retrocruzamientos en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca con animales C57BL/6J. A continuación, los animales floxeados se cruzaron con una segunda estirpe transgénica, en la cual el promotor de la nestina dirige la expresión de la enzima Cre recombinasa (Cre). Estos ratones (#003771-B6.Cg-Tg(Nes-Cre)1Kln/J) se adquirieron a los laboratorios Jackson (Jackson Laboratory).

La nestina es una proteína filamentosa intermedia de clase VI que se expresa en células progenitoras y en tejidos en desarrollo, pero principalmente en el SNC y periférico (Bernal & Arranz, 2018). Durante el desarrollo embrionario del ratón, la Nestina empieza a expresarse a partir de los 7 días de gestación (E7) principalmente en la placa neural, mientras que a E10 su expresión se extiende por todo el sistema nervioso (Mignone *et al.*, 2004). No obstante, no es hasta el periodo embrionario tardío cuando la recombinación Cre/LoxP empieza a ser efectiva, aproximadamente a partir de E15 - E18 (<https://www.jax.org/>) (Liang *et al.*, 2012). Esto nos va a permitir analizar qué papel juega *Cdh1* durante el desarrollo postnatal del sistema nervioso central.

Así, se generaron animales deficientes en *Cdh1* que contienen las secuencias LoxP en homocigosis (Lox/Lox) (García-Higuera *et al.*, 2008) y el transgén de la nestin-Cre (+/N), en adelante nombrados como *Cdh1* cKO. Los ratones portadores del transgén (+/N) se utilizaron como grupo Control, con el fin eliminar variables en el estudio derivadas de la

presencia del transgén en el genoma del ratón (Brouwers et al., 2014). Para el estudio se han empleado animales a diferentes edades de estudio, P0, P7, P14 y P21, con el fin de analizar el progreso del desarrollo postnatal.

2. GENOTIPADO DE ANIMALES

La identificación de los animales Control y Cdh1 cKO se realizó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), amplificando secuencias concretas de varios alelos de Cdh1 y del transgén de Cre. Para ello, se empleó una biopsia de la cola de los ratones, que es el procedimiento de obtención de tejido que se realiza de manera mayoritaria en roedores que están identificados previamente (Naranjo & Pintado, 2017).

2.1. Extracción del DNA

El DNA genómico se extrajo a partir de fragmentos de aproximadamente 2-4mm de la cola de los animales. En primer lugar, se trató el tejido con una solución de lisis (Tampón TEN: 50mM Tris pH 7,5; 5mM EDTA pH 8,0; 100mM NaCl suplementada al momento con 1mM DTT; 0,5mM espermidina y 100µg/ml de proteinasa K (Sigma Aldrich) durante toda la noche en un termobloque a 55°C con agitación. A continuación, se inactivó la proteinasa K mediante calor a 100°C durante 5 minutos (min). Finalmente, y para eliminar el detrito tisular, las muestras se centrifugaron a 7000xg y 4°C durante 5 min.

2.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar genotípicamente los diferentes grupos de estudio realizamos PCR para amplificar las secuencias de interés, por un lado, secuencias LoxP y por otro secuencias del transgén Cre (Mullis, 1990). Para cada reacción se preparó una mezcla compuesta por: 13,95µl de agua libre de nucleasas; 2,5µl de tampón EcoTaq (10x); 5µl de betaína (5M); 0,75µl de MgCl₂ (50mM); 0,5µl de dNTPs (10mM); 0,25µl de cada

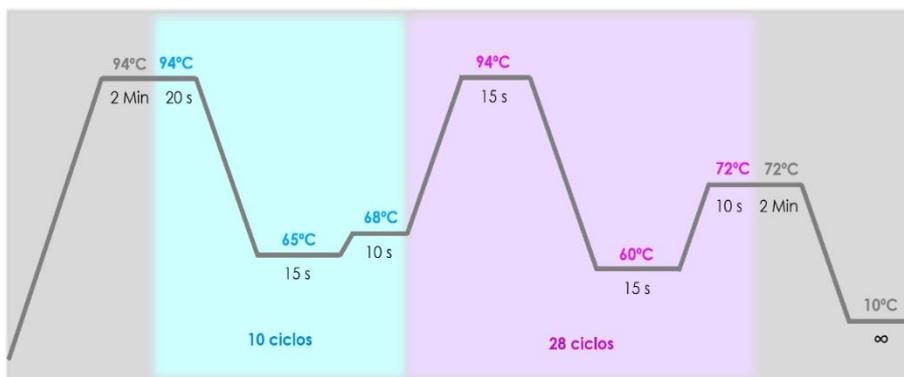
primer (Cdh1-Fw 100µM; Cdh1-Rv 100µM; Cre-Fw 100µM; Cre-Rv 100µM; YFP-Fw 20µM; YFP-Rv 20µM;); 0,3µl de EcoTaq y 1,5µl de muestra.

Los *primers* empleados para amplificar las secuencias específicas se muestran en la **tabla 1**. Los fragmentos de las secuencias LoxP fueron diseñados por la doctora Irene García Higuera (García-Higuera et al., 2008), mientras que los laboratorios Jackson (Jackson laboratory) diseñaron las secuencias para amplificar el transgén Cre. Los primers se adquirieron a Thermo Fisher.

| Gen | Secuencia |
|------------|-------------------------|
| Cdh1-Fw | AGCATGGTGACCGCTTCATCC |
| Cdh1-Rv | TGGCTGGGGGACTTCTCATTTCC |
| Cre-Fw | CCGGTTATTCAACTTGCACC |
| Cre-Rv | CTGCATTACCGGTCGATGCAAC |
| YFP-Fw | ACAGACACACACCCAGGACA |
| YFP-Rv | CGGTGGTGCAGATGAACTT |

Tabla 1. Secuencias de los *primers* empleados en la amplificación de los fragmentos de interés.

La PCR se realizó en un termociclador Eppendorf (Mastercycler® ep, Eppendorf), siguiendo las instrucciones del fabricante Bioline. Todo el proceso se llevó a cabo en un medio tamponado a pH 8,8 según el siguiente programa: 10 ciclos de amplificación a una temperatura de anillamiento de 65°C y 28 ciclos a una temperatura de anillamiento de 60°C, tal y como se muestra en el **esquema 6**.



Esquema 6. Ciclos de temperatura necesarios para la amplificación de los fragmentos de interés a la hora de realizar la PCR.

2.3. Electroforesis en geles horizontales de agarosa

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (p/v) (Sigma Aldrich), previamente teñidos con *Midori Green* (Thermo Fisher) (1:20.000). La electroforesis se realizó en tampón TAE (Tris 40mM, ácido acético glacial 20mM, Na₂EDTA·2H₂O 1mM) y empleando un colorante 6X como tampón de carga (Tris 10mM pH 7,6; azul de bromofenol 0,03 (v/v), xileno cianol 0,03%, glicerol 60%, Na₂EDTA·2H₂O 60mM). Finalmente, los distintos fragmentos de DNA amplificados se visualizaron mediante un transiluminador (Gel Doc XR, BioRad Laboratories), tal y como muestra la **Figura 1**.

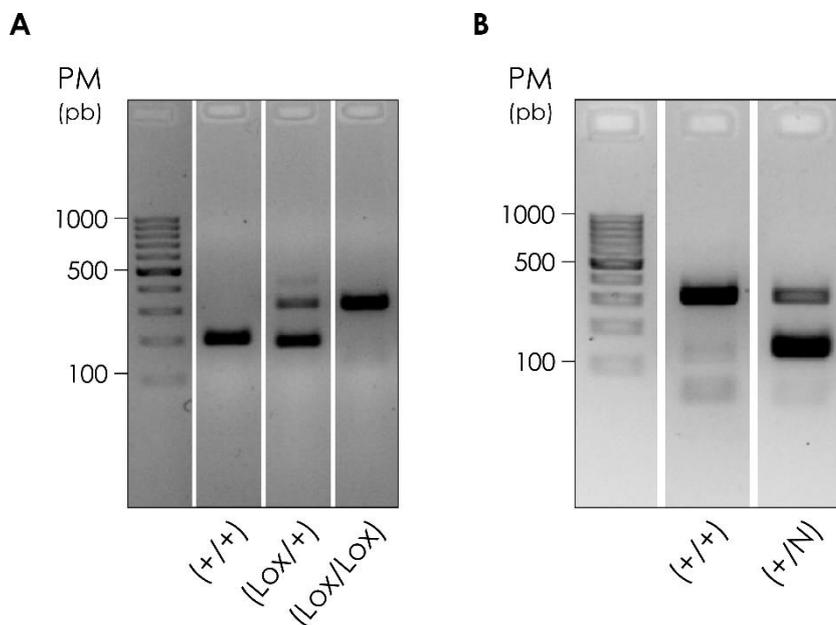


Figura 1. Análisis de los productos de PCR. Electroforesis de los fragmentos amplificados en la PCR. **(A)** Alelo homocigoto (+/+) (168pb), heterocigoto (Lox/+), y homocigoto (Lox/Lox) (286pb). **(B)** Alelo homocigoto (+/+) para el transgén de la nestin-Cre (324pb) y hemicigoto (+/N) (150pb).

3. RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

3.1. Adquisición de imágenes con peso T2

En resonancia magnética nuclear (RMN), T2 es el tiempo que tarda la magnetización transversal inducida por una estimulación de radiofrecuencia, en presencia de un potente campo magnético, en descender en un 63% de su fuerza máxima. Los valores de T2 varían en los distintos tejidos biológicos dependiendo tanto de la estructura molecular, como del estado sólido o líquido de la materia. El T2 es más largo en líquidos que en sólidos, o en los tejidos formados por grandes moléculas. Podemos aprovechar esta característica física para determinar el grado de compactación de la sustancia blanca en el cerebro de los ratones (Chavhan et al., 2009; Knight et al., 2016).

Para la obtención de las imágenes de RMN a P21, los ratones fueron sacrificados mediante sobredosis de anestesia. Para ello, se inyectó intraperitonealmente una mezcla en proporción 1:3 de clorhidrato de

xilacina (Rompún®, Bayer) y ketamina (Imalgène®; Merial), y se administró proporcionalmente al peso corporal de los animales (2ml/Kg peso corporal). Inmediatamente, tras el sacrificio, los animales fueron sumergidos en una solución de Somogy (4% (p/v) paraformaldehído (PFA); 0,2% (p/v) ácido pícrico; en tampón fosfato (PB) 0,1M; pH 7,4) y almacenados para su posterior escaneo mediante RMN. Previamente a su escaneo, los animales se lavaron con PBS 2 x 10 minutos (min) y se sumergieron en PB dentro de un contenedor compatible con el equipo de RMN.

Las resonancias se llevaron a cabo en el laboratorio de técnicas instrumentales de la Universidad de Valladolid, y se realizaron en un sistema de RMN pre-Clinico de 9,4T (Agilent Technologies). Se adquirieron 10 cortes con un grosor de 1mm sin separación por cerebro con una resolución espacial de $7,5 \times 7,5 \times 1 \mu\text{m}^3$. Se adquirieron imágenes con peso T2 (*multi slice multi echo* (MSME)) con tiempos de eco entre 10 y 160ms y tiempo de repetición de 3500ms. El *field of view* (FOV) adquirido fue de 34mm x 34mm y la matriz de imagen de 256 x 256 pixels.

3.2. Análisis de los valores del mapa T2

Las imágenes adquiridas se utilizaron para generar los mapas T2 del tejido cerebral de los ratones. Para la obtención de los mapas se realizó un ajuste monoexponencial del decaimiento de la señal T2 con 3 variables. Los mapas resultantes se analizaron con el software ImageJ, y se seleccionaron las áreas cerebrales correspondientes mediante regiones de interés (ROI). Las medidas de los valores de T2 se analizaron estadísticamente para determinar las diferencias entre los animales Control y Cdh1 cKO.

4. ESTUDIOS HISTOLÓGICOS

4.1. Obtención de muestras de tejido

Los animales fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal con una mezcla en proporción 1:3 de clorhidrato de xilacina (Rompún®, Bayer) y ketamina (Imalgène®; Merial). Dicha mezcla se administró de manera proporcional al peso corporal de los animales (1 ml/Kg peso corporal). A continuación, se procedió a la perfusión del animal vía aórtica con solución Somogyi (Bobo-Jiménez et al., 2017).

La perfusión y fijación es un proceso esencial para conservar lo más fielmente posible la estructura y propiedades originales del tejido. De esta manera, se evita la autólisis de las células, la insolubilización de los componentes celulares y se evitan distorsiones y retracciones del tejido (Martínez et al., 1970). Primeramente, se expone el corazón mediante la abertura de la caja torácica y, para evitar la coagulación de la sangre, se inyecta 0,1ml de heparina sódica a través del ventrículo izquierdo. Seguidamente se conecta a la aorta una bomba peristáltica a través de una cánula y se bombea solución salina (NaCl 0,9%) durante un minuto para lavar el sistema cardiovascular. Finalmente, se administra el fijador durante 15 min (Bobo-Jiménez et al., 2017).

Una vez fijado el tejido, se procedió a la extracción del encéfalo de manera cuidadosa para no dañarlo y se seccionó coronalmente, empleando una matriz coronal (#RBM-2000S. ASI Instruments). Posteriormente, y para una mejor fijación del mismo, se sumergieron los encéfalos en solución fijadora durante 2h a temperatura ambiente (RT), y se eliminó el exceso de fijador mediante lavados seriados con PB 0,1M, pH 7,4 y a RT (Lopez-Fabuel et al., 2022).

Posteriormente, el tejido fue crioprotejido por inmersión en soluciones seriadas de concentración ascendente de sacarosa en PB 0,1M (10%, 20% y 30% (p/v)), a RT y hasta la saturación del tejido. Este proceso es esencial, ya que permite la congelación del tejido sin que se formen cristales y así evitar su rotura (Porteros et al., 2007). A continuación, los

encéfalos se encastraron en solución OCT® (Tissue-Tek®, Sakura) y empleando criomoldes (Tissue-Tek®, Sakura). A continuación, los criomoldes se posicionaron horizontalmente en una superficie metálica helada con nitrógeno líquido, para su congelación gradual, y se almacenaron a -80°C. Finalmente, los encéfalos se cortaron en secciones seriadas de 10 y 20 µm (Criostato Leica CM 1050 Ag Protect; Leica Biosystems), y se almacenaron a -20°C.

4.2. Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica es una técnica de elevada sensibilidad y ampliamente utilizada para detectar antígenos específicos en tejidos mediante el uso de anticuerpos, mayoritariamente dirigidos contra proteínas (Magaki et al., 2019). En primer lugar, las secciones se lavaron 3 veces durante 5 min a RT y en agitación orbital (AgO) constante con PB 0,1M, pH 7,4. Para eliminar la autofluorescencia de los grupos aldehídos retenidos en el tejido, las cortes se sometieron a un pretratamiento con cloruro de amonio (NH₄Cl) 0,1M durante 30 min, a RT (Honvo-Houéto & Truchet, 2015), y se lavaron de nuevo (3x5 min) con PB 0,1M, pH 7,4.

El proceso de fijación puede alterar la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, haciendo inaccesible los antígenos. Por ello, son necesarios tratamientos como la recuperación antigénica y la permeabilización del tejido, con el fin de recuperar la unión antígeno-anticuerpo y facilitar la penetración de los anticuerpos (Gautier, 2017). Algunos de los anticuerpos empleados en este estudio requieren estos procesos, los cuales se especifican en la **tabla 2** de anticuerpos utilizados.

A continuación, se incubaron los anticuerpos primarios junto con 0,2% Tritón X-100 y 5% (v/v) suero fetal de cabra o burro (#005-000-121, #017-000-121, Jackson Immuno-Research) durante 48-72 horas a 4°C. Seguidamente, se lavaron las secciones (3x10 min) con PB 0,1M, pH7,4 y se procedió a la incubación con los anticuerpos secundarios en PB 0,1M pH7,4 durante 2 horas a RT y oscuridad. Transcurrido el tiempo de

incubación, se lavaron los cortes de nuevo con PB 0,1M, pH7,4, y se efectuó la tinción de núcleos con 0,5µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol C₁₆H₁₅N₅) en PB 0,1M durante 10 min a RT y oscuridad. Finalmente, y tras los tres últimos lavados con PB 0,1M, los cortes se sellaron con el medio de montaje Fluoromount TM® (Sigma Aldrich). Todos los anticuerpos utilizados se detallan en la siguiente **tabla 2**.

| | ANTICUERPO | ESPECIE | DILUCIÓN | TRATAMIENTO | REFERENCIA | CASA COMERCIAL |
|-------------|------------------|---------|----------|-------------------|-------------|----------------|
| PRIMARIOS | APC (CC1) | Ratón | 1/500 | - | ab16794 | Abcam |
| | BrdU | Conejo | 1/250 | Clorhídrico 2N | ab152095 | Abcam |
| | MBP | Conejo | 1/500 | - | 836504 | Biologend |
| | MBP | Ratón | 1/1000 | Citrato-Calor | ab40390 | Abcam |
| | MOG | Conejo | 1/500 | - | GTX106283 | GeneTex |
| | NeuN | Ratón | 1/1000 | - | MAB377 | Millipore |
| | NF200 | Conejo | 1/500 | Tritón 0,3% RT | AB1989 | Millipore |
| | Olig2 | Conejo | 1/1000 | - | ab109186 | Abcam |
| | Olig2 | Cabra | 1/1000 | - | AF2418 | R&D Systems |
| | PDGFRa | Cabra | 1/500 | - | AF1062 | R&D Systems |
| SECUNDARIOS | Alexa 488 | Cabra | 1/500 | - | ab150129 | Abcam |
| | Alexa 568 | Conejo | 1/500 | - | ab175470 | Abcam |
| | Cy2 | Ratón | 1/500 | - | 115.225.003 | Jackson |
| | Cy2 | Conejo | 1/500 | - | 111.225.003 | Jackson |
| | Cy3 | Ratón | 1/500 | - | 111.165.003 | Jackson |
| | Cy3 | Conejo | 1/500 | - | 111.175.003 | Jackson |
| | Cy5 | Conejo | 1/500 | - | 111.175.144 | Jackson |

Tabla 2. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los estudios histológicos por inmunohistoquímica.

4.3. Tinción Nissl

Para el estudio de la morfología, distribución y tamaño de tejido encefálico empleamos la tinción Nissl. Ésta se fundamenta en la tinción

selectiva de los componentes básicos de la célula (Newman et al., 2009), y en nuestro caso, se utilizó el violeta de cresilo como colorante esencial.

En primer lugar, los cortes se sumergieron durante 12 horas en una solución 1:1 de etanol absoluto y cloroformo. Posteriormente, se llevó a cabo el proceso de rehidratación del tejido mediante inmersiones secuenciales, comenzando con un disolvente orgánico, seguido de soluciones seriadas decrecientes de alcoholes, y concluyendo con agua destilada (H₂O_d) (xileno (x2) – etanol 100% (x2) - 96% - 90% - 80% - 70% - 60% - 50% - H₂O_d).

A continuación, los cortes se tiñeron con violeta de cresilo al 0,1% (p/v) y ácido acético glacial al 0,3% (v/v) (solución en H₂O_d) durante 5 min a RT; se eliminó el exceso de colorante con H₂O_d y se diferenció el tejido en etanol 96% durante unos min, hasta conseguir la coloración deseada. Finalmente, se deshidrataron los cortes mediante inmersión en etanol absoluto y xileno (x2) durante 10 min, y se montaron cubres de cristal con solución Entellan® (#1.07961.0100 Merck Millipore) (Bobo-Jiménez et al., 2017).

4.4. Ensayo BrdU *in vivo*

La proliferación de los precursores de oligodendrocitos *in vivo* se analizó mediante la inyección intraperitoneal de BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina C₉H₁₁BrN₂O₅). Este nucleótido sintético, análogo de la timidina, sustituye casi en su totalidad a la timidina durante la fase de síntesis de ADN, siendo la detección del BrdU sinónimo replicación celular (Bick & Davidsontt, 1974).

Se inyectaron animales de P7 y P21 intraperitonealmente con BrdU a una dosis de 50mg/ml. Transcurridas 2h, se procedió a la perfusión de los animales y extracción de los encéfalos, a los que se les realizó la técnica de inmunohistoquímica siguiendo el protocolo descrito previamente. De esta manera, se analizaron los precursores de oligodendrocitos que se encontraban en fase S en ambas edades de estudio (Sengottuvel et al., 2023b).

Por otro, y con el fin de estudiar la diferenciación de los oligodendrocitos a 14 días de vida postnatal, ratones de ambos genotipos fueron inyectados con BrdU a P7 y P8, y posteriormente los ejemplares se perfundieron a la semana. Esta estrategia nos permitió analizar si los precursores que se encontraban en fase S a los 7 días de vida postnatal eran capaces de diferenciar y madurar a P14.

5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

El estudio de la ultraestructura del encéfalo se realizó por microscopía electrónica de transmisión. Para ello, contamos con el servicio de microscopía electrónica de NUCLEUS, de la Universidad de Salamanca. El proceso de encastrado, corte y contraste lo realizamos con la ayuda de los técnicos del servicio.

5.1. Fijación del tejido

Para realizar los estudios de microscopía electrónica, los animales se perfundieron siguiendo el protocolo mencionado anteriormente, con una excepción, el tipo de fijador, en este caso se empleó glutaraldehído al 2% y PFA al 2%. Se realizaron dos postfijaciones. La primera de ellas de 2h a RT con la solución fijadora y la segunda con tetróxido de osmio al 1% durante 60-90 min a 4ª y en oscuridad. A continuación, las zonas de interés se cortaron en cubos de aproximadamente 1mm, para ser posteriormente incluidos en resina (Lopez-Fabuel et al., 2022).

5.2. Deshidratación e inclusión

La deshidratación del tejido se realizó mediante gradaciones de etanol ascendentes, terminando en óxido de propileno (50% - 70% - 80% - 90% - 95% - 100% x2 – óxido de propileno x3) durante 10 min, en agitación y RT. A continuación, los bloques se incluyeron en resina Epon 812 (Epoxy Embedding Medium Resin, Sigma Aldrich) siguiendo las siguientes proporciones: i) óxido de propileno/Resina Epon 3:1 durante 1 hora; ii) óxido de propileno/Resina Epon 1:1 durante toda la noche; iii) óxido de propileno/Resina Epon 1:3 durante 1 hora; iv) Resina Epon pura durante

1 hora. Para la inclusión final los bloques se colocaron y sumergieron en los moldes definitivos con la resina Epon, siempre teniendo en cuenta la orientación deseada. Finalmente, los bloques se dejaron secar en la estufa a 60°C hasta su polimerización (aproximadamente 12 horas) (Stadtländer, n.d.; Winey et al., 2014).

5.3. Corte y contrastado

Los bloques se seccionaron, en primer lugar, en cortes semifinos (de aproximadamente 0,5 μm), a los que se realizó una tinción con azul de toluidina y así localizar la región de estudio, y posteriormente en cortes ultrafinos (de aproximadamente 60 nm) mediante un ultramicrotomo Ultracut E (Reichert/Leica). Los diferentes cortes ultrafinos se recogieron sobre soportes de cobre denominados rejillas. A continuación, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo, con el fin de visualizar mejor la ultraestructura del tejido (Stadtländer, n.d.; Winey et al., 2014).

6. ANÁLISIS DE IMÁGENES

Las imágenes de microscopía óptica se realizaron empleando dos microscopios confocales: Spinning disk Roper Scientific con microscopio Olympus IX81 (Olympus®) equipado; Andor Dragonfly Spinning Disk (AndorTechnology, Oxford Instruments) equipado con 4 láseres (405nm, 445nm, 488nm y 561 nm), cámara SONA, y software de adquisición Fusion 2.2. De este equipo cabe destacar, que algunas de sus especificaciones permiten realizar deconvolución en las imágenes, adquisición de superresolución y *stitching*. Las imágenes fueron procesadas mediante el software FIJI (ImageJ64). Las cuantificaciones se realizaron en cuatro cortes coronales seriados, con el fin de analizar las mismas estructuras encefálicas desde la zona más frontal hasta las áreas occipitales. Se analizaron 3 fotos por corte y los resultados se mostraron como la media de los valores \pm error estándar de la media (S.E.M).

Las nanofotografías se tomaron con un microscopio electrónico de transmisión Thermo Fisher Tecnai Spirit Twin 120 kv con filamento LaB6, microanálisis EDX y STEM, cámara CCD Gatan ES1000W CCD Wide angle lateral, y empleando el software iTEM. Para la microscopía electrónica se analizaron 20 imágenes por animal y se representó la media de los valores \pm S.E.M.

7. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE ANÁLISIS DE TRANSFERENCIA TIPO WESTERN

7.1. Extracción de proteínas

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical según el RD 53/2013, capítulo 2 artículo 7 anexo III. A continuación, se procedió a la extracción del encéfalo en solución salina 0,9% y en frío, se separaron los hemisferios por la comisura interhemisférica y se congelaron de manera separada en nitrógeno líquido para ser almacenados en el ultracongelador (-80°C) durante un mínimo de 12 horas.

Para procesar y homogenizar el tejido se utilizó un tampón de lisis RIPA (Na_2HPO_4 10mM, Tritón X-100 al 10% (v/v), SDS al 0,1% (p/v), EDTA 12,5mM y NaCl 150mM) suplementado con inhibidores de fosfatasa (fluoruro sódico (NaF) 50mM y ortovanadato sódico 1mM) e inhibidores de proteasas (aprotinina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tosil lisina clorometil cetona (TLCK) 100 μM , inhibidor de tripsina extraída de la soja (Soybean) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 μM , N-p-tosil-L-fenilamina clorometil cetona (TPCK) 100 μM , pestatina A 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y fenantrolina 1mM). El protocolo empleado se describe a continuación: i) el homogenizado se mantuvo en hielo durante 30 min; ii) se hirvieron las muestras a 100°C durante 5 min; iii) se sonicaron con frecuencia de 50-60Hz y aplicación Sweep para reducir las zonas de poca potencia en el baño de ultrasonidos con la ayuda de la oscilación electrónica del campo acústico durante 10 min; y finalmente iv) se centrifugaron a 15600xg, 4°C y durante 10 min.

La concentración total de proteínas se determinó en los sobrenadantes resultantes de la extracción de tejido. Ésta se llevó a cabo mediante el sistema colorimétrico basado en el ácido bicínico (BCA Protein Assay Reagent, Pierce). Se empleó la albúmina sérica bovina (BSA) como estándar. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

7.2. Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Las proteínas (30-70 μg) de los extractos proteicos obtenidos se resuspendieron en tampón de carga 2x (Glicerol al 30% (v/v) y azul de bromofenol al 0,25% (p/v) en H_2O), se hirvieron a 100°C durante 5 min y se centrifugaron a $15600\times g$ a 4°C . A continuación, se separaron por electroforesis en condiciones desnaturizantes y en gel de poliacrilamida SDS-Page (solución de acrilamida/bis-acrilamida 29:1; BioRad Laboratories) del 6-10%, en función del peso molecular de la proteína de interés. La separación de proteínas se realizó en un sistema de electroforesis vertical (MiniProtean-3®; BioRad Laboratories) y en presencia de tampón de electroforesis (Tris 25mM, glicina 200mM y SDS al 01% (p/v); pH 8,3). Se utilizó el marcador comercial PageRuler™ Plus (Thermo Fisher) como marcador de peso molecular para un rango de 10-250kDa.

Al finalizar la separación, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond®, Amersham Bioscience), utilizando el sistema Mini-Transblot (BioRad Laboratories) y en presencia de tampón de transferencia (Tris 25mM, glicina 192mM y metanol al 20% (v/v); pH 8,3).

7.3. Inmunodetección de proteínas por western blot

Una vez transferidas las proteínas a las membranas, éstas se bloquearon durante 2 horas con leche (Sveltesse, Nestle) al 5% (p/v) en TTBS (Tris 20mM, NaCl 500mM, Tween-20 al 0,1% (v/v); pH 7,5) y a RT. Transcurrido el bloqueo, se lavaron con TTBS (3x5 min) y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario específico en TTBS

suplementado con leche al 2% o BSA al 2%. Los anticuerpos empleados en el procedimiento se especifican en la tabla adjunta (**Tabla 3**), junto a la concentración empleada. La proteína GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) se llevó a cabo como control de carga ya que sus niveles de expresión no varían en nuestras condiciones experimentales

| ANTICUERPO | ESPECIE | DILUCIÓN | REFERENCIA | CASA COMERCIAL |
|--------------------|---------|----------|--------------|----------------|
| Primarios | | | | |
| Cdh1 | Ratón | 1/1000 | MS1116-P1ABX | Thermo |
| GAPDH | Ratón | | AM4300 | Ambion |
| MBP | Conejo | 1/2000 | ab40390 | Abcam |
| NF200 | Conejo | | AB1989 | Millipore |
| Secundarios | | | | |
| Anti-ratón | Cabra | 1/10.000 | 170-6516 | BioRad |
| Anti-conejo | Cabra | 1/10.000 | Sc-2030 | Santa Cruz |

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los estudios de expresión proteica por transferencia tipo western blot.

Al día siguiente, se retiró el anticuerpo primario y se lavaron las membranas con TTBS pH 7,5 (3x5 min), seguidamente, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente, suplementado con leche al 2% o BSA al 2%. Transcurridas 2 horas de incubación, las membranas se lavaron de nuevo con TTBS (3x5 min) y un lavado con TBS (TTBS sin Tween-20). Finalmente, en función de la proteína a detectar, las membranas se revelaron utilizando diferentes reactivos de quimioluminiscencia: Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology), Super Signal West Dura (Pierce™, Thermo Fisher) y Pierce™ Plus Western Blotting Substrate (Thermo Fisher). La señal de las membranas se expuso a películas Super HR-U X-Ray Film (Fujifilm Medical) y posteriormente se introdujeron en la máquina de revelado (M35 X-OMAT Processor, KODAK).

7.4. Cuantificación

Las cuantificaciones se realizaron con triplicados de cada condición experimental y edad de estudio. Para ello, se utilizó el software FIJI (ImageJ64), normalizando cada condición frente a su control de carga. Los resultados obtenidos se expresaron como unidades arbitrarias de cantidad de proteína respecto al control respectivo de cada edad de estudio.

7.5. Stripping de membranas

La técnica de *Stripping* permite desanclar los anticuerpos primarios de las proteínas ya detectadas, haciendo posible la incubación de la membrana con otros anticuerpos primarios distintos a los iniciales (Kurien & Scoo Eld Editors, 2015). Así, en algunos casos las membranas se incubaron durante 10 min con *Restore Western Blot Stripping Buffer* (Thermo Fisher). Seguidamente se lavaron las membranas con TTBS pH 7,4 (3x5 min) y a continuación, se procedió primero al bloqueo de las mismas y posteriormente a la incubación con los anticuerpos primario, secundario y revelado final, tal y como se ha descrito previamente.

8. AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN DEL RNA

8.1. Extracción del RNA total

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical según el RD 53/2013, tal y como se ha especificado con anterioridad. A continuación, se extrajeron los encéfalos, separando los hemisferios por la comisura interhemisférica y rápidamente se congelaron mediante inmersión en nitrógeno líquido. Posteriormente, se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

La extracción del RNA se llevó a cabo con el reactivo TRI Reagent® (Sigma Aldrich), comúnmente conocido como TRIzol. Esta solución es una mezcla de tiocianato de guanidina y fenol, la cual permite extraer RNA, DNA y proteínas del mismo extracto tisular.

Las muestras se homogenizaron manualmente con 1ml de TRIzol por 50-100mg de tejido. A continuación, se eliminaron los detritos por centrifugación (12.000xg 10 min a 4°C) y los sobrenadantes obtenidos se incubaron durante 10 min con 1-bromo-3-cloropropano. El resultado es la aparición de tres fases: una fase roja orgánica en la cual se encuentran las proteínas, la interfase, que es de color blanco y contiene el ADN, y la fase acuosa superior con el RNA soluble (Rio et al., 2010). La fase acuosa de cada muestra se recoge en un tubo nuevo para seguir con la purificación, mientras que el resto de las fases se almacenaron a 4°C para su posterior procesamiento.

Para continuar con la purificación del RNA, la fase acuosa se trató con 2-propanol durante 10 min, precipitando el RNA. Posteriormente se lavaron las muestras con etanol al 75% en agua DEPC al 0,1%, y se centrifugó a 12.000xg durante 10 min a 4°C. Finalmente, se dejaron secar las muestras parcialmente, se resuspendieron en un tampón de elución (Sigma Aldrich) y se hirvieron durante 10 min a 55°C.

La concentración del extracto de RNA se midió mediante espectrofotometría UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Fisher). El ratio de la absorbancia A260/280nm, que determina la pureza del RNA, fue de entre 1,9 – 2,1; mismos valores se obtuvieron de la ratio A260/230nm, indicador de contaminantes fenoles (Lucena-Aguilar et al., 2016).

8.2. Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

La expresión diferencial de determinados genes se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real (rt-qPCR). Se analizaron los cambios en la expresión génica de los distintos animales respecto a una muestra de referencia de expresión constante, es decir, se realizó una cuantificación relativa frente a un control.

Los *primers* se diseñaron con los software *Geneious* (Versión *pro-Trial*, BiomattersLimited) y *Amplifix* (Universidad de Marsella), en regiones

codificantes y entre exones, con el fin de minimizar la amplificación de ADN. A continuación, se determinaron las eficiencias de los *primers*, aceptando como óptimas las comprendidas entre el 85-115% (*Guide to performing Relative Quantification of gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*, Applied Biosystems). Determinar las eficiencias de trabajo de cada pareja de *primers* es imprescindible para poder analizar los datos mediante el Método Comparativo de C_t ($\Delta\Delta C_t$) (Schmittgen & Livak, 2008). En la **tabla 4** se muestran las secuencias y las condiciones en las que se emplearon los distintos *primers*.

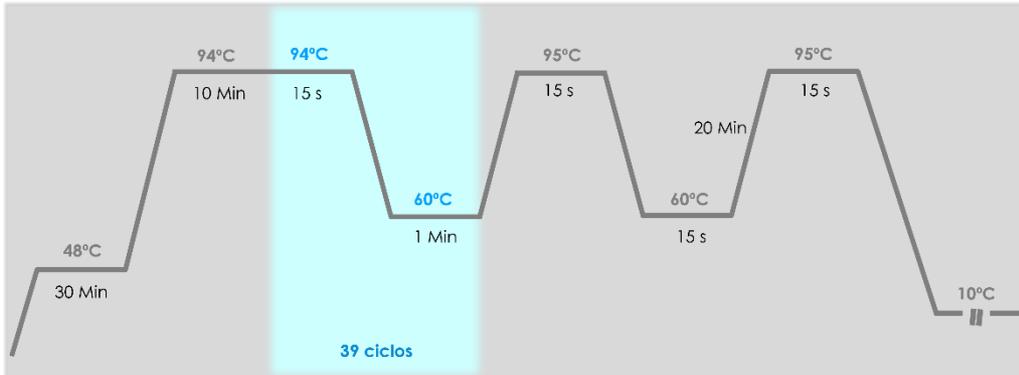
| Gen diana | Secuencia 5' – 3' | Conc. (μM) | Eficiencia |
|--------------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------|
| Olig2-Fw | TCCCCAGAACCCGATGATCTT | 0,2 | 93 % |
| Olig2-Rv | AGGAGGTGCTGGAGGAAGATGA | | |
| Pdgfr α -Fw | TGCCTTGAAAGCAACGTCAG | 0,3 | 99 % |
| Pdgfr α -Rv | CAGGTCAACGACCTCGTGT | | |
| CC1-Fw | GTGGACTGTGAGATGTATGGGC | 0,3 | 102 % |
| CC1-Rv | CACAAGTGCTCTCATGCAGCCT | | |
| GalC-Fw | ATCTCTGGGAGCCGATTCCTC | 0,3 | 109 % |
| GalC-Rv | CCACACTGTGTAGGTCCAGGA | | |
| GAPDH-Fw | TCAGCAATGCCTCCTGCACCA | 0,3 | 104 % |
| GAPDH-Rv | GCATGGACTGTGGTCATGAG | | |

Tabla 4. Secuencias y condiciones empleadas de los primers de los genes analizados por rt-qPCR.

La PCR a tiempo real permite cuantificar la expresión de genes, ya que la amplificación y la detección tiene lugar de manera simultánea. El *SYBR Green*, un fluorocromo que se intercala entre las hebras de ADN bicatenario, emite fluorescencia a medida que se amplifica el fragmento de interés, de modo que ésta es proporcional a la abundancia de producto de PCR amplificado (amplicón) (Dragan et al., 2012).

Para determinar los niveles de expresión de los diferentes genes del estudio, se utilizó el kit comercial *Power SYBR® Green RNA-to- C_t ™ 1-Step Kit* (Applied Biosystems), el cual posibilita el acoplamiento de la retrotranscripción y la amplificación en un solo paso. Se analizaron 40ng

de RNA por muestra en un volumen final de reacción de 20µl. En todos los casos se realizaron las determinaciones por triplicado empleando un termociclador CFX96 de BioRad. El perfil de la reacción se muestra en el esquema 7.



Esquema 7. Programa de rt-qPCR. Perfil de la reacción de rt-qPCR en el cual se detalla el número de ciclos, temperatura y tiempo de cada etapa.

Una vez obtenido el C_t (*Threshold cycle*), punto en el que se detecta la fluorescencia emitida por el SYBR Green dentro de la fase lineal, se procedió a refinar los datos y determinar los incrementos de C_t (ΔC_t). Para ello, se calculó la diferencia entre el C_t del gen de interés y el C_t del *housekeeping*, en nuestro caso la GAPDH. A continuación, los datos se relativizan a la media de las muestras control, dándole el valor de 1. Así, valores mayores o inferiores a 1 indican incrementos o decrementos de la expresión de un determinado gen en la muestra problema, mientras que valores cercanos a 1 no representan cambios en la expresión. Los resultados se mostraron en unidades arbitrarias de expresión y frente respecto a la media de los controles.

9. METABOLÓMICA

Animales de 21 días de vida postnatal se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo el cerebro, separando los hemisferios por la línea media y se congelaron rápidamente por inmersión en nitrógeno líquido. Posteriormente, los hemisferios izquierdos de un total de 6 animales por

genotipo (Control y Cdh1 cKO), se mandaron en condiciones de frío a la empresa especializada *Metabolon* (Morrisville, EEUU), con el fin de realizar un estudio metabolómico no dirigido, y así obtener la mayor información posible sobre los niveles de estos metabolitos en nuestras muestras. Estos estudios nos proporcionaron información sobre el estado metabólico del cerebro y, sobre todo, nos aportó datos relevantes del metabolismo lipídico en ausencia de Cdh1.

El servicio de *Metabolon* realizó el estudio metabólico mediante el acoplamiento en tándem de cromatografía líquida de alta resolución a espectrometría de masas (UPLC-MS/MS). Las muestras se procesaron. Se identificaron los datos primarios y se realizó un posterior curado de los datos, normalización normalizándolos para su comparación relativa y control de calidad. Una vez transformados los registros, los compuestos significativamente diferentes se identificaron mediante la prueba estadística *t* de Welch, aceptando una estimación baja de falsos descubrimientos $q\text{-valor} \leq 0.05$, y una significatividad $p\text{-valor} \leq 0.05$.

En el estudio se detectaron un total de 751 metabolitos diferentes. El análisis de componentes principales, la matriz de correlación de metabolitos y el *heatmap* de los metabolitos aumentados o disminuidos se realizó empleando la herramienta online *MetaboAnalyst 5.0*.

10. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el software *Graph PadPrism*. Se aplicaron distintas pruebas estadísticas dependiendo de los datos a analizar. En cada apartado descrito, se especifican el número de ratones y la prueba estadística empleada. Para llevar a cabo comparaciones entre dos grupos experimentales se realizó el test de la *t* de *Student*. Mientras que en los estudios metabolómicos se utilizó la prueba *t* de *Welch*. En todos los casos, se consideró un $p < 0,05$ estadísticamente significativo, representado como * para $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO MURINO DEFICIENTE EN Cdh1 DURANTE EL NEURODESARROLLO POSTNATAL

1.1. Antecedentes experimentales

Resultados previos demuestran que Cdh1 es esencial para el correcto desarrollo del encéfalo, de manera que Cdh1 coordina el acoplamiento entre la proliferación de los progenitores neurales y el inicio de la neurogénesis y, con ello, el tamaño y organización de la corteza cerebral (Delgado-Esteban et al., 2013; Eguren et al., 2013). Hemos identificado una nueva mutación de Cdh1 (p.Asp187Gly) en humanos que causa la desestabilización de Cdh1 y, en consecuencia, la inactivación del complejo APC/C-Cdh1, lo que resulta en importantes trastornos neurológicos como microcefalia, retraso psicomotor y epilepsia. Recientemente, se han descrito nuevas mutaciones patogénicas de Cdh1 en humanos que provocan epilepsia, autismo y discapacidad intelectual (Manivannan et al., 2022).

El cuerpo calloso desempeña una importante función en la transmisión de señales entre los dos hemisferios cerebrales (Tanaka-Arakawa et al., 2015). Así, las malformaciones y/o alteraciones de las fibras del cuerpo calloso promueven la aparición de patologías del neurodesarrollo, entre ellas agenesia o disgenesia del cuerpo calloso, trastornos del espectro autista, esquizofrenia y epilepsia, entre otros (de León Reyes et al., 2020).

El paciente que portaba la mutación p.Asp187Gly de Cdh1, fue diagnosticado de agenesia del cuerpo calloso (datos no publicados). La imagen por resonancia magnética mostró una reducción en la mielinización del esplenio del cuerpo calloso a los 4 meses postnatales (**Figura 2A y B**). La baja intensidad del brazo posterior de la cápsula interna del paciente (flecha cian), no alcanza la porción retrolenticular (flecha rosa), lo que indica un retraso en la mielinización (**Figura 2C y D**).

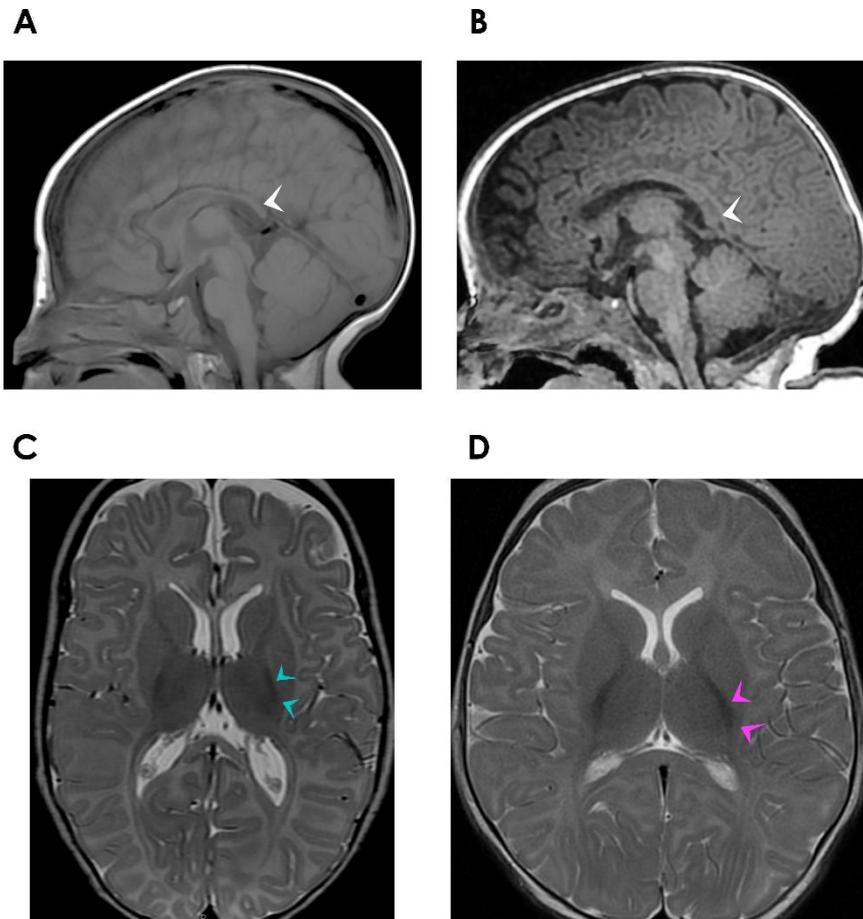


Figura 2. La mutación Asp187Gly de Cdh1 causa alteraciones en el cerebro postnatal humano (1). Imágenes sagitales de la resonancia magnética en peso T1 del paciente a los 4 meses de edad (A) y de un individuo control a la misma edad (B). Resonancia magnética en peso T2 del paciente (C) y de un individuo sano a los 4 meses de edad (D).

Del mismo modo, en la **Figura 3** se aprecia que la mielinización de las áreas prerrolándicas en el paciente, se limita al *centrum semiovale* (flecha blanca), mientras que, en el control, las áreas hipointensas son más amplias y se extienden hasta la circunvolución pre y postcentral.

Recientemente, Manivannan y colaboradores han descrito dos mutaciones en la secuencia de Cdh1 que provocan encefalopatías epilépticas e hipomielinización en pacientes de temprana edad (Manivannan et al., 2022).

Por todo ello, Cdh1 parece estar implicado en el proceso de mielinización durante el desarrollo postnatal.

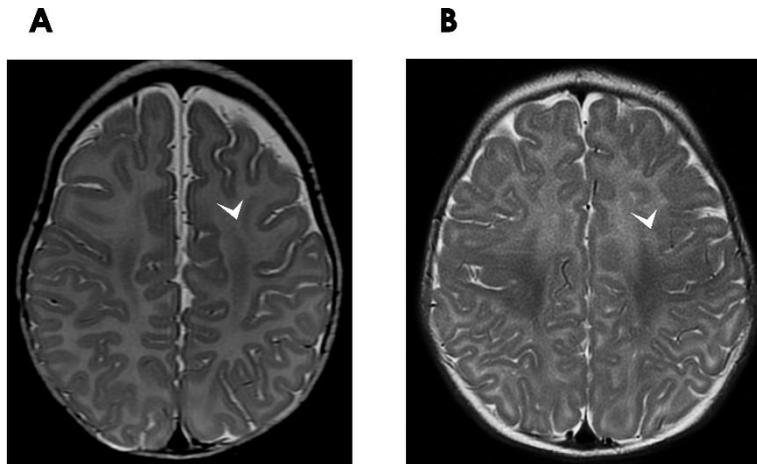


Figura 3. La mutación Asp187Gly de Cdh1 causa alteraciones en el cerebro postnatal humano (II). Imágenes de la resonancia magnética en peso T2 del paciente a los 4 meses de edad (A), y de un individuo sano a la misma edad (B).

1.2. Caracterización fenotípica del modelo murino deficiente de Cdh1 en el sistema nervioso

Desde hace años, nuestro grupo se ha centrado en el estudio de las funciones de APC/C-Cdh1 en los procesos fundamentales para el desarrollo y funcionamiento del SNC. Entre estos procesos se incluyen la neurogénesis, la diferenciación y supervivencia neuronal (A. Almeida et al., 2005b; Delgado-Esteban et al., 2013b), la sinaptogénesis y la plasticidad neuronal (A. Almeida, 2012a; J. Huang & Bonni, 2016), el metabolismo glucídico (Bonvento & Bolaños, 2021b; Herrero-Mendez et al., 2009), los procesos neurodegenerativos y el deterioro cognitivo (Bobo-Jiménez et al., 2017; Lapresa, Agulla, Gonzalez-Guerrero, et al., 2022).

Teniendo en cuenta las alteraciones en la mielinización detectadas en los pacientes que portan mutaciones patogénicas de Cdh1, decidimos investigar la función de Cdh1 en los procesos de oligodendrogénesis y mielinización, tras el nacimiento. Para ello,

utilizamos un modelo experimental *in vivo* deficiente en Cdh1 de manera condicional a la expresión de nestina, generando así ratones *knock out* carentes de Cdh1 (Cdh1 cKO) en etapas tardías del desarrollo embrionario, siendo la recombinación eficiente a partir de E15-E17 (Liang et al., 2012). Durante este periodo, el proceso de neurogénesis está prácticamente completado (Sauvageot & Stiles, 2002). Por ello, nuestro modelo ofreció una ventaja relevante ya que nos permitió estudiar la gliogénesis de manera independiente al papel de Cdh1 durante el desarrollo embrionario de la corteza cerebral. De hecho, como mostramos más adelante, los ratones deficientes en Cdh1 no mostraron microcefalia al nacer, aunque sí en etapas más avanzadas del desarrollo (**Figura 5**).

El modelo experimental se estableció mediante el sistema Cre-LoxP (Kim et al., 2018). Ratones que contienen los exones 2 y 3 del gen *Fzr1* flanqueados por secuencias LoxP (García-Higuera et al., 2008), se cruzaron con animales que expresan la Cre recombinasa bajo el promotor de la nestina. Así, se generaron animales homocigotos para los alelos floxeados (Lox/Lox) y transgénicos para la Nestin-Cre (+/N). Los ratones resultantes se denominaron Cdh1 cKO. Los animales que portan el transgén (+/N) fueron empleados como Control del estudio.

En primer lugar, evaluamos la eficiencia del modelo analizando los niveles proteicos de Cdh1, mediante inmunodetección por transferencia de tipo *western blot* (**Figura 4**). En el momento del nacimiento, los animales Cdh1 cKO presentaron una reducción de aproximadamente el 60% de los niveles de Cdh1, siendo prácticamente inexistentes a partir de los 7 días postnatales, edad importante y punto álgido para la proliferación de los OPCs (Zhang et al., 2018). En el gráfico de la **Figura 4**, se observa la disminución progresiva de los niveles de Cdh1. Es importante resaltar que los niveles postnatales de Cdh1 aumentaron durante los primeros 7 días de vida, mientras que disminuyeron a los 14 días postnatales (**Figura 4**), lo que sugiere que Cdh1 podría tener una función importante durante la primera semana de vida.

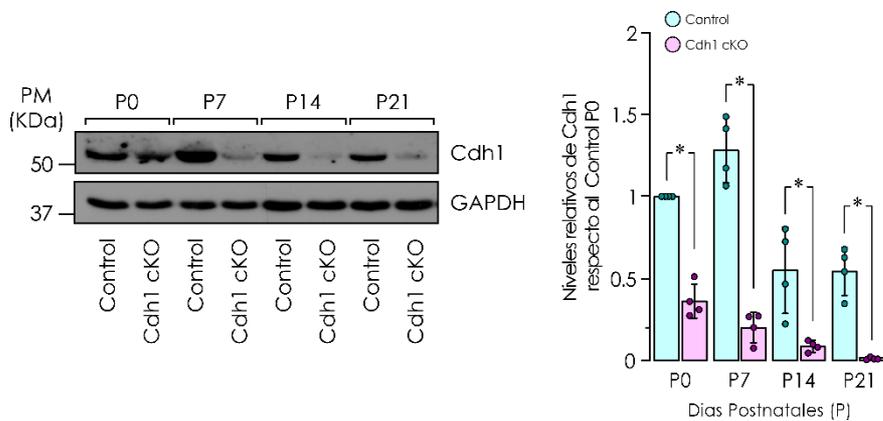


Figura 4. Detección de los niveles de Cdh1 en el encéfalo, tras el nacimiento. Immunodetección de Cdh1 en extracto total de encéfalo a distintas edades de estudio. La cuantificación se normalizó frente al Control P0 y se empleó GAPDH como control de carga. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 4 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

Además, se observaron diferencias fenotípicas a P7, siendo especialmente evidentes a partir de P14 (**Figura 5**). Los animales Cdh1 cKO presentaron un menor tamaño y peso corporal, respecto a los animales Control de su misma edad, sugiriendo que la inactivación de APC/C-Cdh1 promueve un severo retraso del crecimiento. La delección de Cdh1 desde los precursores neurales (etapas embrionarias tempranas), no originó diferencia alguna en cuanto al peso corporal en el momento del nacimiento (Delgado-Esteban et al., 2013). Sin embargo, la mutación humana p.Asp187Gly del gen Cdh1 promovió retraso en el crecimiento del paciente (Rodríguez et al., 2019), evidenciando así el papel esencial del complejo durante el crecimiento y el desarrollo postnatal. Por tanto, la deficiencia de Cdh1 induce un retraso en el crecimiento corporal, tras el nacimiento.

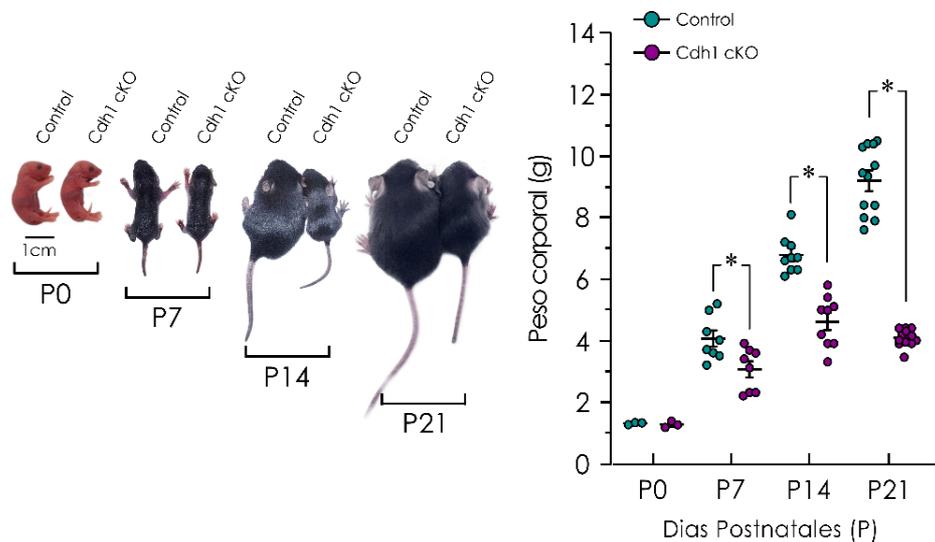


Figura 5. La ausencia de Cdh1 reduce el peso corporal y el tamaño de los animales. Ratones Control y Cdh1 cKO a P0, P7, P14 y P21. Los animales Cdh1 cKO presentaron un retraso severo en el crecimiento, respecto a los Controles de la misma edad. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. del número de individuos que se muestra mediante puntos independientes * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student

La inactivación de APC/C-Cdh1 en neuronas glutamatérgicas durante la etapa adulta, altera la morfología de la corteza, siendo ésta más estrecha, hecho que va acompañado de una reducción del peso encefálico (Bobo-Jiménez et al., 2017). De la misma manera, la falta de Cdh1 en etapas embrionarias tempranas produce microcefalia (paper María; Eguren, 2013). Los resultados representados en la **Figura 6A** demuestran la relevancia del complejo en el desarrollo y mantenimiento de la corteza cerebral, durante las etapas peri y postnatal. Los encéfalos de los ratones Cdh1 cKO mostraron diferencias importantes en el tamaño y forma de los hemisferios corticales, siendo el peso del encéfalo significativamente inferior a partir de los 7 días de vida postnatal. No obstante, la relación peso encéfalo/peso corporal es inversamente proporcional (**Figura 6B**), lo que sugiere que la falta de Cdh1 en el sistema nervioso no solo afecta al tamaño encefálico sino que, además, altera el desarrollo postnatal del individuo.

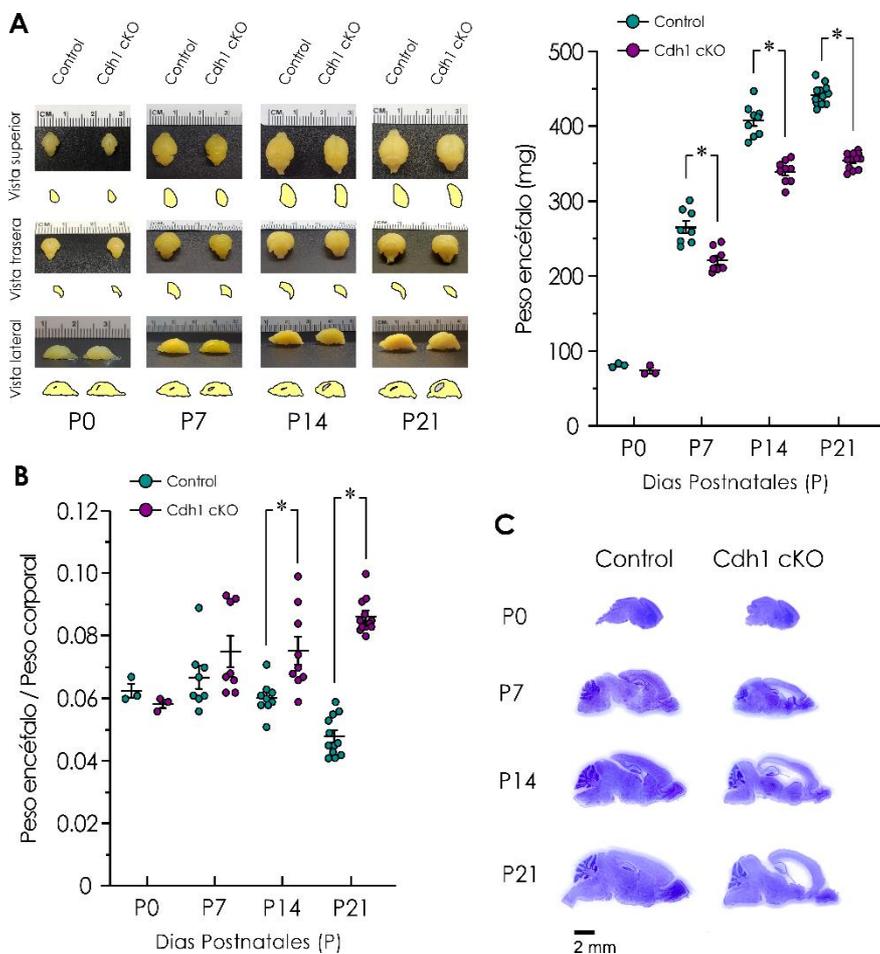


Figura 6. La ausencia de Cdhl disminuye el peso del encéfalo. (A) Imágenes representativas de cerebros de ratones Cdhl cKO y Controles a P0, P7, P14 y P21. Los datos son la media \pm S.E.M., del número de individuos que se muestra mediante puntos independientes. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student. **(B)** Relación entre el peso encefálico y peso corporal. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student **(C)** Tinción Nissl de cortes sagitales, donde se observan alteraciones estructurales y morfológicas en los animales Cdhl cKO.

Como se ha descrito anteriormente (Eguren et al., 2013b), los ratones Cdhl cKO presentaron hidrocefalia. La presión ejercida por el exceso de líquido cefalorraquídeo promovió un aumento de los ventrículos laterales (ventriculomegalia) y el desplazamiento de estructuras encefálicas importantes para los procesos de aprendizaje y memoria, tales como la

corteza cerebral y el hipocampo (Bobo-Jiménez et al., 2017), hechos que promueven una alteración estructural generalizada en el encéfalo de los ratones Cdh1 cKO (**Figura 6C**).

Por tanto, la actividad de APC/C-Cdh1 es esencial para el crecimiento postnatal del individuo, así como para el desarrollo del encéfalo. Nuestro modelo mimetiza los efectos observados en el paciente que porta la mutación p.Asp187Gly de Cdh1 (Rodríguez et al., 2019), lo que avala su utilización en el presente trabajo.

1.3. La deficiencia de Cdh1 promueve disgenesia del cuerpo calloso

Como se muestra en las **Figuras 2**, la mutación p.Asp187Gly de Cdh1 provoca alteraciones en la formación del cuerpo calloso en humanos. Por ello, y con el objetivo de estudiar el efecto de la falta de Cdh1 sobre la formación postnatal del cuerpo calloso, se realizó un análisis de imagen por resonancia magnética nuclear de animales Control y Cdh1 cKO. Las imágenes T2 de los ratones Cdh1 cKO confirmaron la ventriculomegalia y las alteraciones en el empaquetamiento del cuerpo calloso (**Figura 7**). Es más, en los animales Cdh1 cKO apenas se visualizó la compactación del cuerpo calloso a los 21 días de vida postnatal, lo que demuestra disgénesis del cuerpo calloso. Por tanto, Cdh1 es esencial para la formación de esta estructura cerebral.

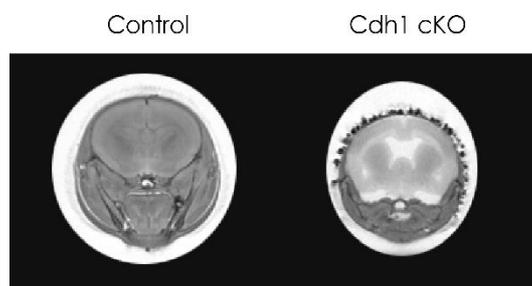


Figura 7. La falta de Cdh1 provoca ventriculomegalia. Imágenes coronales de resonancia magnética con peso T2 de cerebros de animales Control y Cdh1 cKO a 21 días de vida postnatal.

El análisis de los mapas T2 aportan información sobre la cantidad de agua en la región encefálica estudiada e, indirectamente, analizan la densidad celular de la zona. En este contexto, se ha descrito que niveles bajos de T2 están relacionados, por un lado, con bajas cantidades de agua y, por otro, con alta densidad celular (Hattingen et al., 2013). Los valores T2 de los ratones Cdh1 cKO fueron significativamente superiores en todas las zonas estudiadas, siendo más pronunciado el efecto en el cuerpo calloso (**Figura 8**), lo que de nuevo confirma la función esencial de Cdh1 en la génesis de esta estructura. Además, zonas de la corteza altamente mielinizadas, como es el caso de la zona subcortical, también mostraron incrementos importantes en los valores T2. Estos resultados confirman que la inactivación de APC/C-Cdh1 causa hidrocefalia y altera la densidad del tejido encefálico, principalmente en zonas muy mielinizadas como son el cuerpo calloso y la corteza.

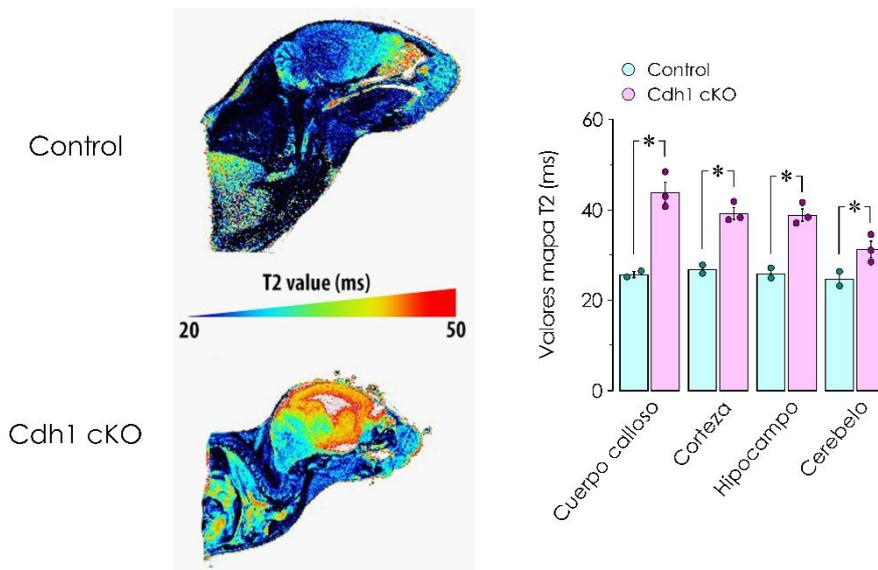


Figura 8. La falta de Cdh1 aumenta los valores T2 en el encéfalo. Imágenes representativas del análisis de los valores T2 en animales Control y Cdh1 cKO a P21. Las cuantificaciones se realizaron en tres secciones sagitales por animal y los resultados se representaron expresando la media \pm S.E.M. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

Posteriormente, se determinó el espesor del cuerpo calloso en distintas etapas del desarrollo postnatal. Para ello, se realizaron inmunohistoquímicas frente al marcador de linaje oligodendroglial Olig2 y se midió el espesor del cuerpo calloso. En la primera semana de vida (P7), el cuerpo calloso presenta un empaquetamiento fisiológico menor, dado que los axones todavía no están mielinizados (Cifuentes-Diaz et al., 2023). A medida que avanza el proceso de mielinización, el cuerpo calloso se va compactando y reduciendo su espesor (Cifuentes-Diaz et al., 2023), hecho que ocurre a P21 (**Figura 9**). Como se observa en la **Figura 9**, a P7 no se visualizaron diferencias entre ambos genotipos. Sin embargo, a P21 el grosor del cuerpo calloso de los ratones Cdh1 cKO fue significativamente inferior a los animales Control. Estos resultados, junto con la reducción en la densidad celular del tejido confirman la disgenesia del cuerpo calloso en nuestro modelo experimental.

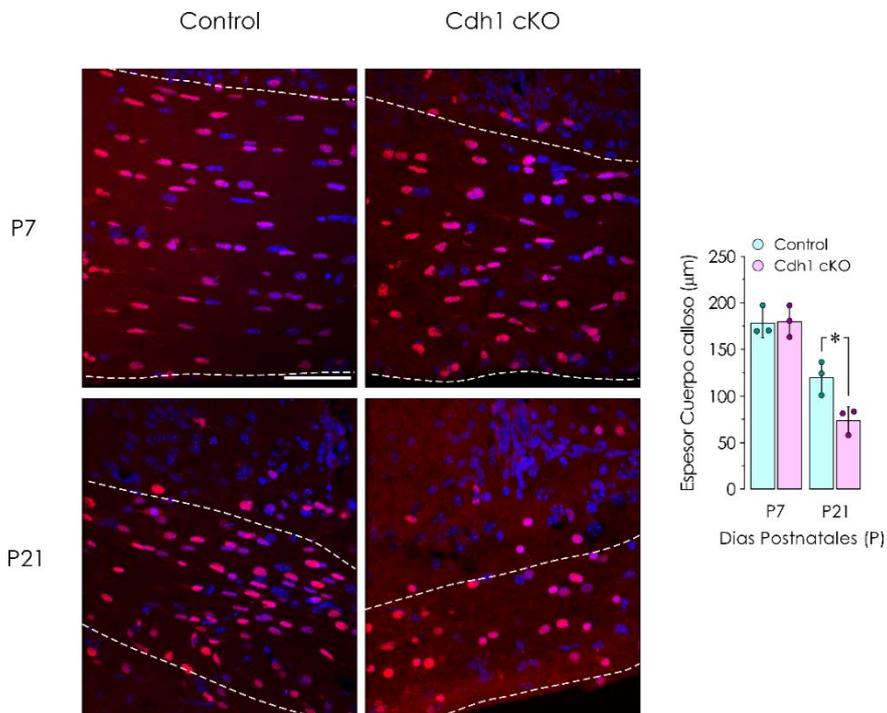


Figura 9. La inactivación de APC/C-Cdh1 provoca agenesia del cuerpo calloso. Microfotografías representativas de inmunohistoquímicas frente a Olig2 (rojo). Las cuantificaciones se realizaron cuatro secciones coronales por animal y se representaron las medias. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

2. LA INACTIVACIÓN DE APC/C-Cdh1 ALTERA LA MIELINIZACIÓN POSTNATAL

2.1. La ausencia de Cdh1 provoca hipomielinización en el encéfalo

La correcta formación de la mielina es esencial para el establecimiento y funcionamiento adecuado de las conexiones neurales y la sinaptogénesis. La mielina no sólo protege los axones y acelera el impulso nervioso, sino que también aporta sustratos metabólicos para los requerimientos energéticos de los axones (Stassart et al., 2018). Los OLs proporcionan lactato a las regiones mielinizadas y aisladas de los axones, facilitando la transmisión sináptica (Fünfschilling et al., 2012). La detección de MBP mediante inmunohistoquímica, permite analizar el grado de mielinización en el encéfalo (van Tilborg et al., 2018b), ya que MBP es necesaria para la compactación adecuada de la vaina de mielina (Ozgen et al., 2016) y, por tanto, su déficit promueve la rotura de la vaina y procesos desmielinizantes.

Como detectamos con las técnicas anteriormente descritas (ver **Figuras 7 y 9**), la inmunodetección de MBP reveló digénesis del cuerpo calloso, ya que observamos importantes alteraciones en la vaina de mielina en los animales Cdh1 cKO a P21 (**Figura 10**). Es más, la mielinización se vio críticamente comprometida en ausencia de Cdh1 (**Figura 10**), a juzgar por la clara disminución de la longitud del cuerpo calloso, así como roturas en la vaina de mielina, compatibles con una desestructuración de la estructura mielínica. Por tanto, Cdh1 es esencial para la mielinización postnatal, de manera que la falta de Cdh1 causa hipomielinización y digénesis del cuerpo calloso.

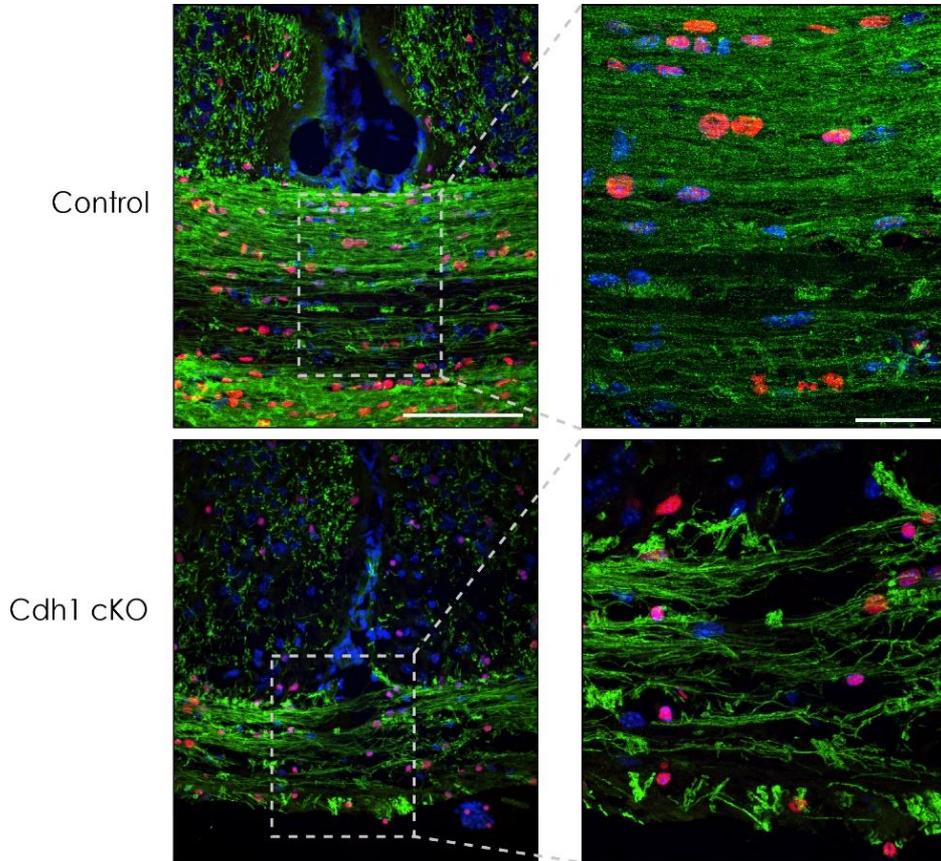


Figura 10. La falta de Cdh1 provoca hipomielinización en el cuerpo calloso. Imágenes representativas de la detección por inmunohistoquímica de la proteína MBP (verde), oligodendrocitos Olig2 (rojo) y DAPI (azul), realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala: 100 μ m. Barra escala: 25 μ m.

Debido al papel esencial de la corteza y el hipocampo en los procesos cognitivos de aprendizaje y memoria (Bobo-Jiménez et al., 2017a), y el cerebelo en la función motora (Buckner, 2013), nos planteamos estudiar el efecto de la ausencia de Cdh1 sobre la mielinización en estas estructuras encefálicas. En todas las zonas analizadas, los ratones Cdh1 cKO mostraron una disminución en los niveles de expresión de MBP, comparado con los ratones Control. De nuevo, observamos roturas en la vaina de mielina en los animales Cdh1 cKO. Así la ausencia de Cdh1 provocó una severa reducción de la mielina en todas las estructuras encefálicas estudiadas, demostrando su

participación relevante en la formación de la mielina y en los procesos de hipomielinización en el cerebro postnatal.

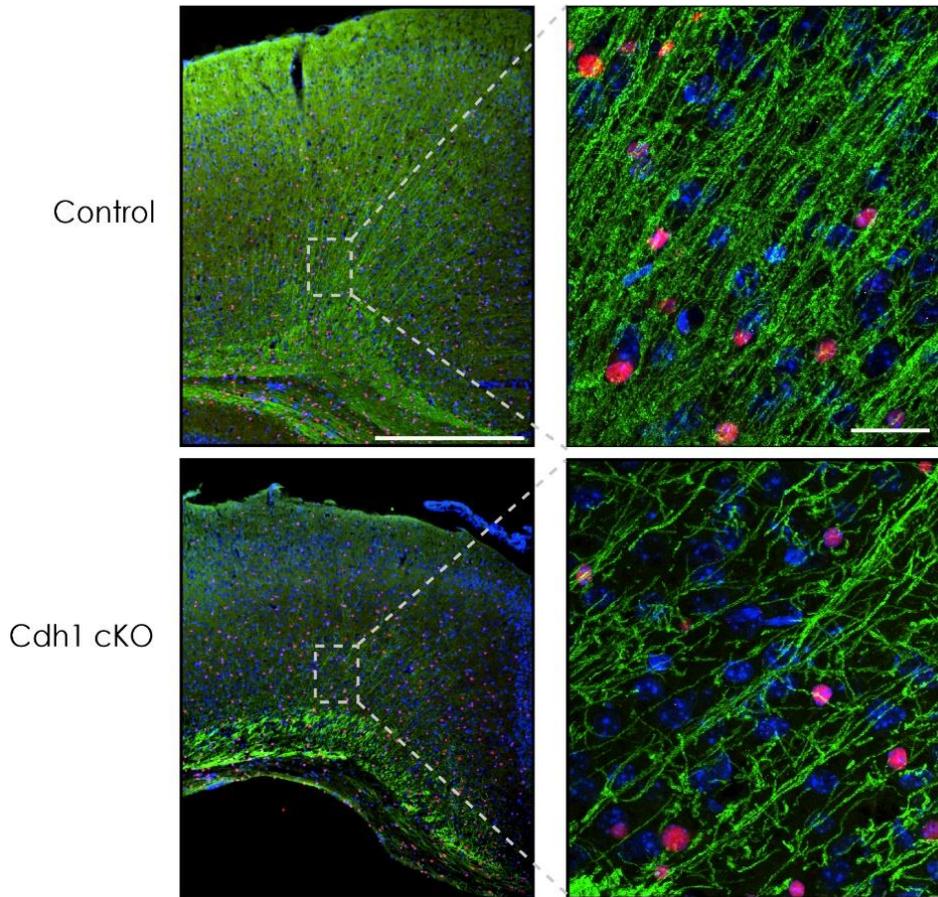


Figura 11. La ausencia de Cdh1 provoca hipomielinización en la corteza cerebral. Imágenes representativas de microscopía confocal de la proteína MBP (verde), oligodendrocitos (rojo) como marcador del linaje oligodendroglial y DAPI (azul) como marcador nuclear, realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala: 500 μ m. Barra escala: 25 μ m

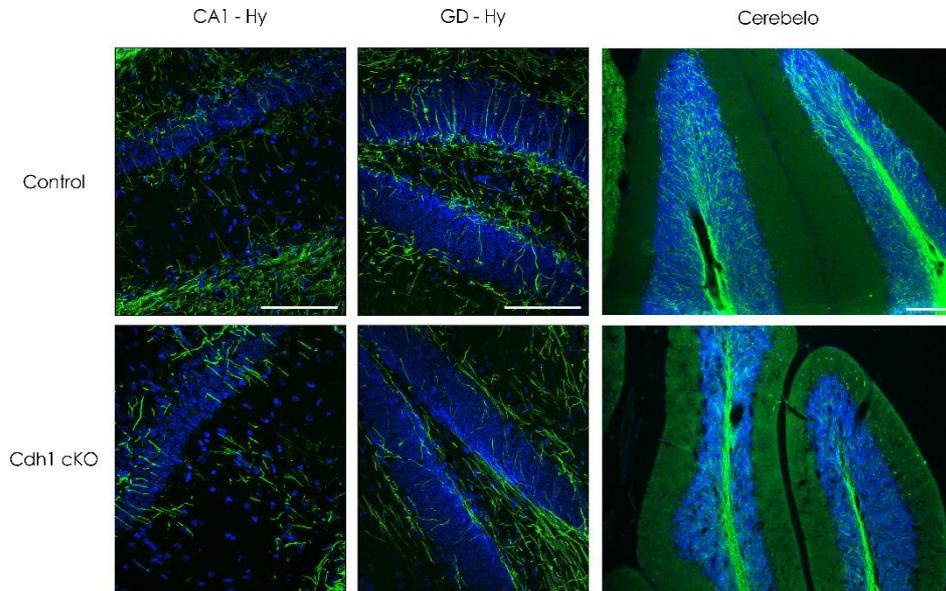


Figura 12. La falta de Cdh1 provoca hipomielinización en el hipocampo y cerebello. Imágenes de las proyecciones máximas de la proteína MBP (verde) y DAPI (azul) como marcador nuclear, realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala Hy-CA1: 100 μ m. Barra escala Hy-GD: 100 μ m. Barra escala cerebello: 200 μ m

Para confirmar las alteraciones estructurales en la mielina, utilizamos otra proteína integrante de la estructura miélinica, como es MOG, utilizado, junto con MBP, como marcador específico de la bicapa miélinica (Zhang et al., 2018). Como se observa en la **Figura 13** la inmunodetección de MOG, que co-localiza perfectamente con MBP, confirmó la severa alteración de la mielina, tanto en la corteza como en el cuerpo caloso, en los animales carentes de Cdh1.

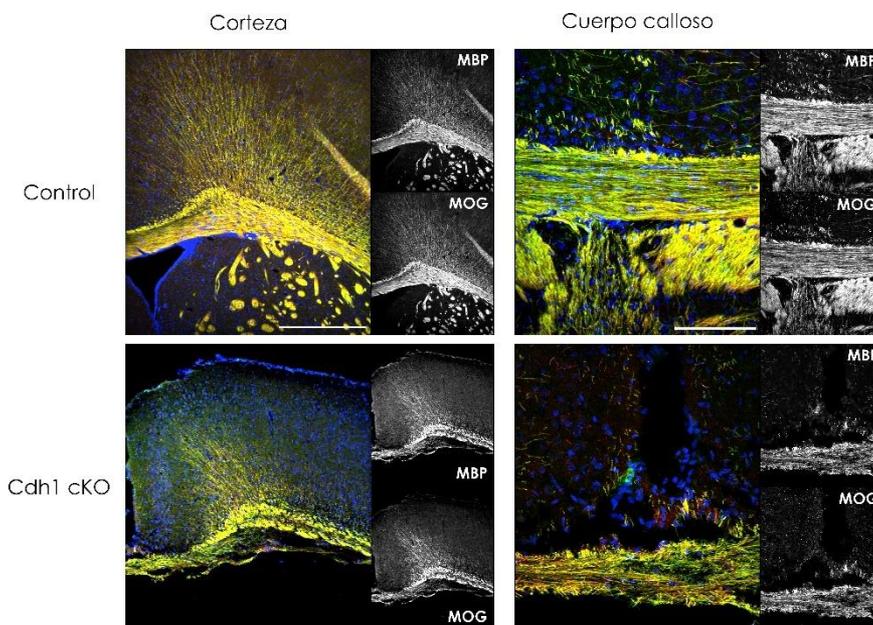


Figura 13. La inmunodetección de MBP y MOG confirma la hipomielinización en los animales Cdh1 cKO. Imágenes representativas de las áreas cerebrales de la corteza y del cuerpo calloso mediante microscopía confocal, de la proteína MBP (verde), MOG (rojo) y DAPI (azul), realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala: 500 μ m. Barra escala: 100 μ m

2.2. La falta de Cdh1 retrasa la mielinización postnatal

En humanos, el proceso de mielinización ocurre principalmente durante el primer año de vida, aunque continúa durante la etapa adulta, especialmente en la corteza prefrontal, hasta aproximadamente los 40 años (van Tilborg et al., 2018b). En el caso de los ratones, este proceso se considera completado a los 60 días de vida postnatal, si bien, a P21 la corteza está altamente mielinizada (Barateiro & Fernandes, 2014). Por tanto, y una vez demostrada la hipomielinización causada por la falta de Cdh1, quisimos estudiar si el efecto observado a P21 era debido a una activación de procesos desmielinizantes o bien a un retraso y/o inhibición de la mielinización postnatal.

Para ello, estudiamos el estado de mielinización de los animales a distintas etapas postnatales (**Figura 14A**). El proceso de mielinización

empieza en las zonas caudales del SNC y progresa hacia las zonas más rostrales, es decir, primero mieliniza la médula, luego el bulbo raquídeo, sigue la corteza occipital y finalmente la corteza prefrontal (Ozgen et al., 2016; Stassart et al., 2018; van Tilborg et al., 2018). A P7, observamos un retraso en la mielinización en los animales Cdh1 cKO, ya que estaban desprovistos de mielina en la médula espinal comparándolos con los ratones Control de su misma edad (**Figura 14A**). Zonas que deberían estar mielinizadas a P14, como es el bulbo raquídeo (van Tilborg et al., 2018), presentaron una disminución de la expresión de MPB en los ratones Cdh1 cKO, lo que indica hipomielinización. Por tanto, nuestros resultados demuestran que la hipomielinización causada por la ausencia de Cdh1 no parece estar asociada a procesos desmielinizantes, sino que se debe a un retraso en la mielinización durante el desarrollo postnatal.

Estos resultados se confirmaron mediante inmunodetección de los niveles de expresión de MBP por *western blot* a los distintos tiempos de estudio (**Figura 14B**). Así, comprobamos que, paralelamente al desarrollo postnatal, los niveles de MBP iban aumentando en los animales Control, proceso que está disminuido en ratones carentes de Cdh1. Es más, los niveles de expresión de MBP fueron menores en los ratones Cdh1 cKO que en los Control, en todas las edades estudiadas.

Por lo tanto, nuestros resultados demuestran que la inactivación de APC/C-Cdh1 altera el proceso de mielinización y promueve el retraso de la formación de la vaina de mielina, durante el periodo postnatal.

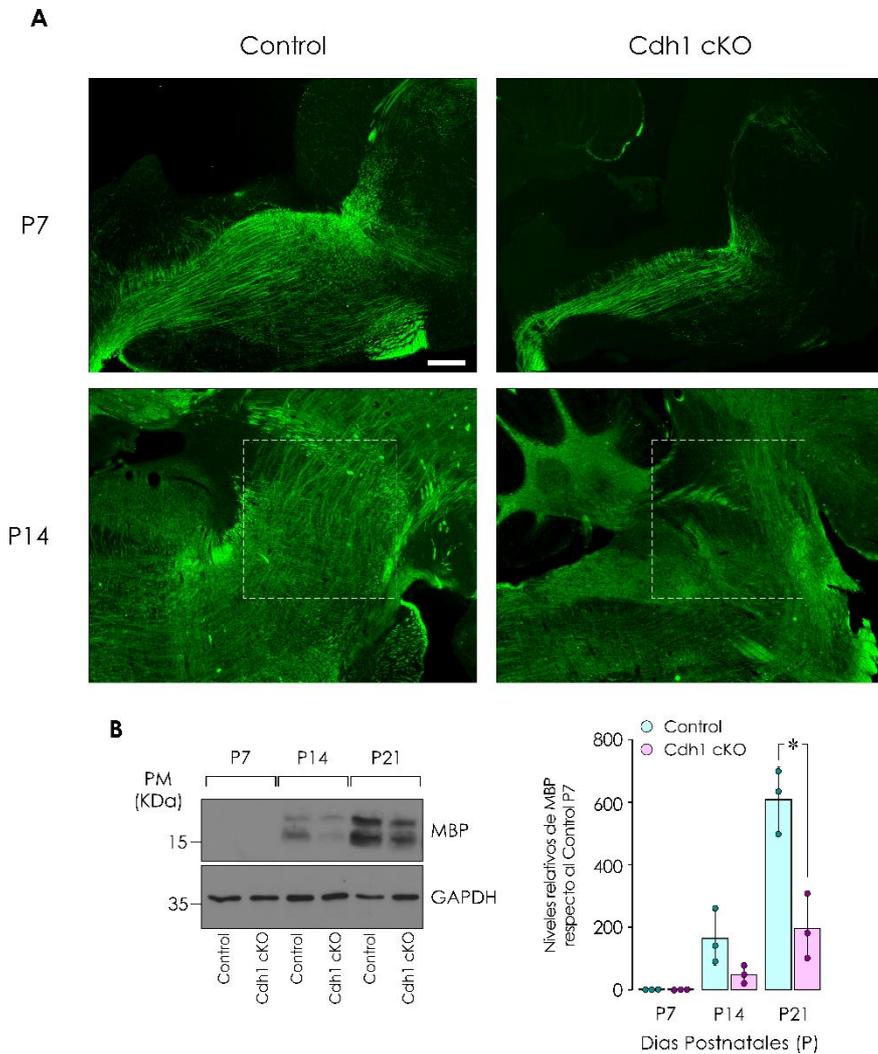


Figura 14. La falta de Cdh1 retrasa la mielinización postnatal. (A) Imágenes representativas de inmunohistoquímicas frente a la proteína MBP (verde), realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P7 y P14. Barra escala: 100 μ m. **(B)** Inmunodetección por *western blot* del cofactor Cdh1 en extractos totales del encéfalo a distintas edades de estudio. La cuantificación se normalizó frente Control P7 y se empleó GAPDH como control de carga. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

2.3. La hipomielinización postnatal causada por la falta de Cdh1 no es consecuencia de pérdida de axones mielinizables

Resultados previos del laboratorio, demostraron que APC/C-Cdh1 regula la integridad dendrítica y supervivencia neuronal en el cerebro adulto. Así, la falta de Cdh1 promueve la desestructuración del citoesqueleto neuronal, debido a la acumulación de la quinasa ROCK2, lo que culmina en neurodegeneración y deterioro cognitivo en el adulto (Bobo-Jiménez et al., 2017). Teniendo en cuenta que el proceso de mielinización está regulado transcripcionalmente e inducido por la interacción entre axón y oligodendrocito (Stassart et al., 2018), analizamos si la hipomielinización de los animales Cdh1 cKO derivaba de posibles cambios en el número de neuronas y, en consecuencia, de axones disponibles para la mielinización.

En primer lugar, analizamos el número de neuronas y oligodendrocitos en la corteza parietal, mediante inmunohistoquímica con marcadores específicos de linaje neuronal, NeuN, y oligodendrocítico, Olig2, en los animales a P21. Como se muestra en la **Figura 15A y 15B**, no se observaron diferencias significativas en el número de ambos tipos celulares entre los genotipos. El número total de neuronas en los animales Control fue similar al obtenido en los ratones Cdh1 cKO. La población oligodendroglial experimentó un leve descenso en ausencia de Cdh1, siendo este indicativo de tendencia, aunque no significativo. Además, se analizó la proporción existente entre ambas poblaciones, mostrando similitud entre ambos genotipos. Estos resultados demuestran que la ausencia de Cdh1 no afecta al número de neuronas o de oligodendrocitos en la corteza parietal durante el desarrollo postnatal.

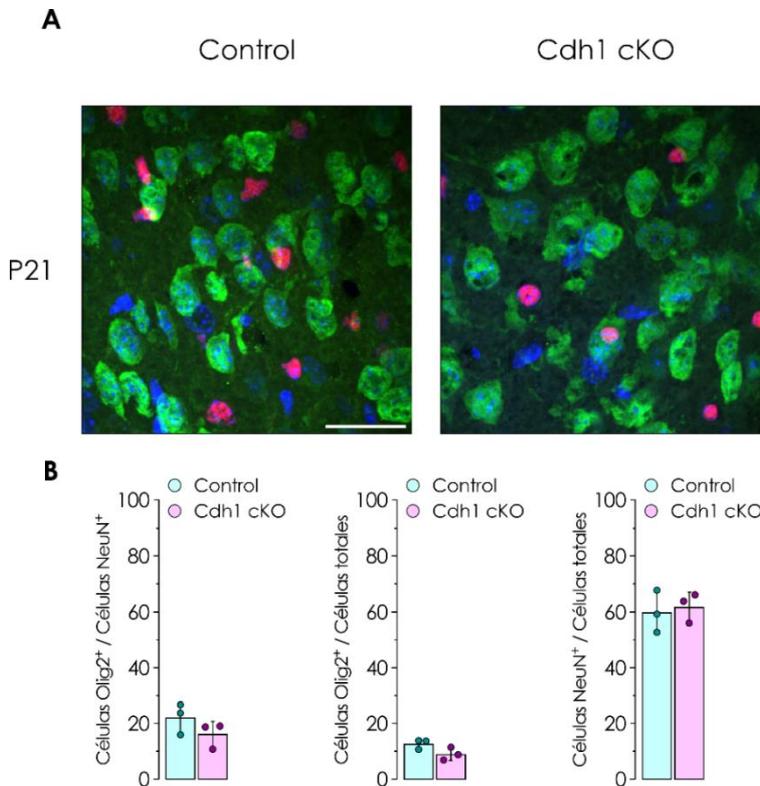


Figura 15. La hipomielinización causada por la falta de Cdh1 no es consecuencia de la pérdida neuronal. (A) Imágenes representativas de la detección por inmunohistoquímica de marcadores poblacionales de NeuN (verde) y Olig2 (rojo), realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala: 25 μ m. **(B)** Proporción de oligodendrocitos por neurona. Las cuantificaciones de las poblaciones neuronales y oligodendrogiales se normalizaron frente al número total de células marcado con DAPI (azul). Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

Una vez descartada la pérdida neuronal como responsable de la hipomielinización en los animales deficientes en Cdh1, nuestro siguiente objetivo fue investigar el estado de la red axónica en el modelo de estudio. Durante la etapa adulta el complejo APC/C-Cdh1 coordina el crecimiento axonal a través de la degradación de Id2 y SnoN (A. Almeida, 2012; Lasorella et al., 2006). Además, mantiene la estabilidad dendrítica y las conexiones neuronales a través de la regulación de los niveles de Rock2 (Bobo-Jiménez et al., 2017). Las interacciones oligodendrocitos-axón son relevantes en la regulación de la mielinización

(R. G. Almeida & Lyons, 2017; Stassart et al., 2018). Así, analizar la red axonal en nuestro modelo experimental nos permitirá evaluar si la posible pérdida axonal es la causa de la hipomielinización de los animales Cdh1 cKO.

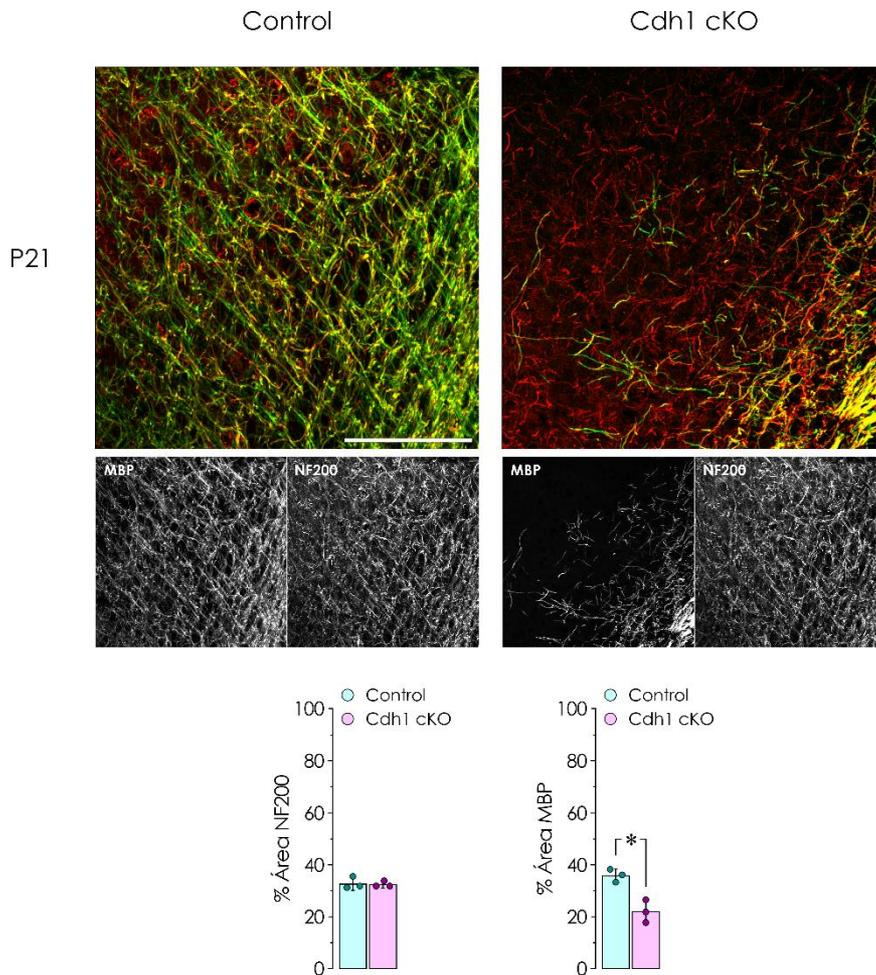


Figura 16. La falta de Cdh1 disminuye los niveles de mielina sin promover alteraciones en los axones de la corteza. Imágenes representativas de microscopía de la proteína MBP (verde) y NF200 como marcador axónico (rojo), realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala: 100 μ m. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

Para ello, realizamos la co-inmunodetección de MBP junto al neurofilamento H (NF200), proteína citoesquelética neuronal ampliamente utilizada como marcador axonal (Trojanowski et al., 1986), lo que nos permitió visualizar el estado de los axones y determinar cuáles de ellos se encontraban mielinizado, en las distintas áreas cerebrales. Como se muestra en la **Figura 17**, la inactivación de APC/C-Cdh1 redujo un 50% la mielina en la corteza cerebral, mientras que los niveles de NF200 permanecieron estables en ambos genotipos. Sin embargo, los ratones Cdh1 cKO mostraron alteraciones en la organización de los axones. La densidad axónica del cuerpo calloso sufrió una reducción del 7%, mientras que los niveles de mielina descendieron en comparación con los animales Control (**Figura 16**).

Del mismo modo, se analizaron la capa CA1 y el giro dentado del hipocampo (**Figura 18A y 18B**). En ambas estructuras no se observaron diferencias significativas en los niveles de NF200, mientras que los niveles de expresión de MBP disminuyeron significativamente. Además, la inmunodetección por *western blot* de NF200 no mostró cambios significativos en extracto total encefálico, lo que confirma que la falta de Cdh1 no altera la red axonal (**Figura 18C**), al menos en los primeros estadios del desarrollo postnatal, lo que descarta que la falta de axones mielinizables sea la causa de la hipomielinización en los ratones Ch1 cKO.

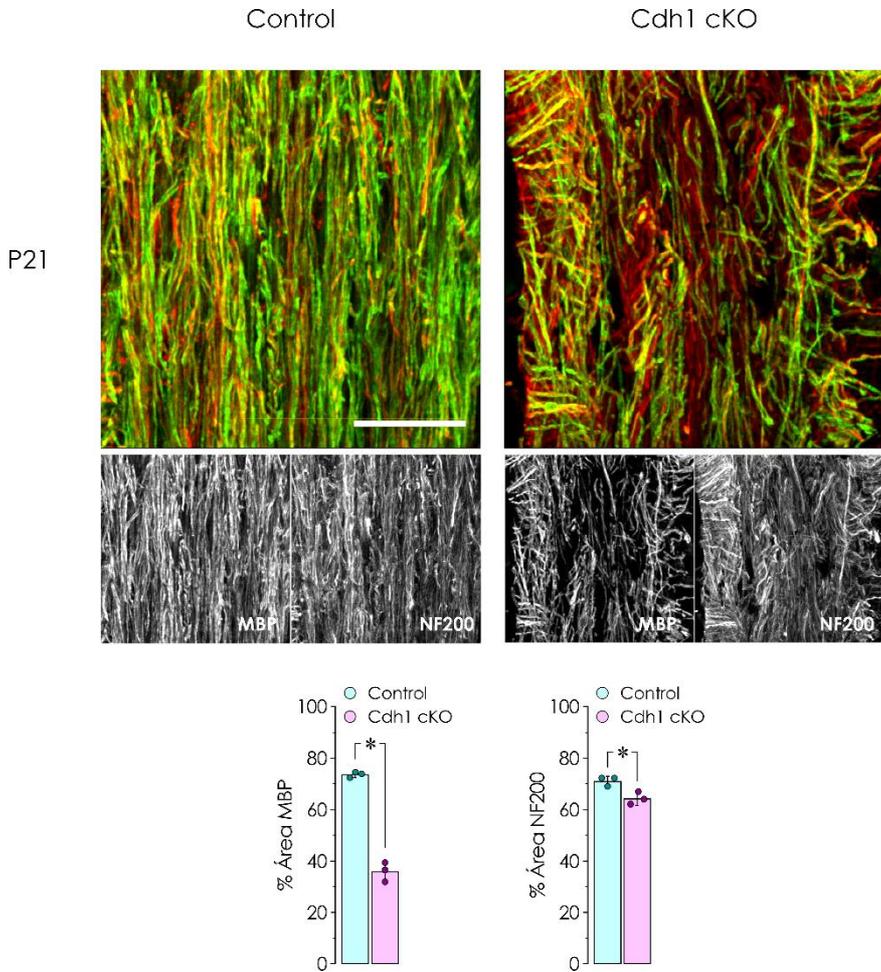


Figura 17. La falta de Cdh1 disminuye los niveles de mielina en los axones del cuerpo calloso. Imágenes representativas de microscopía confocal tras la tinción de la proteína MBP (verde) y NF200 como marcador axónico (rojo), realizadas en cortes coronales de animales Control y Cdh1 cKO a P21. Barra escala: 100 μ m. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

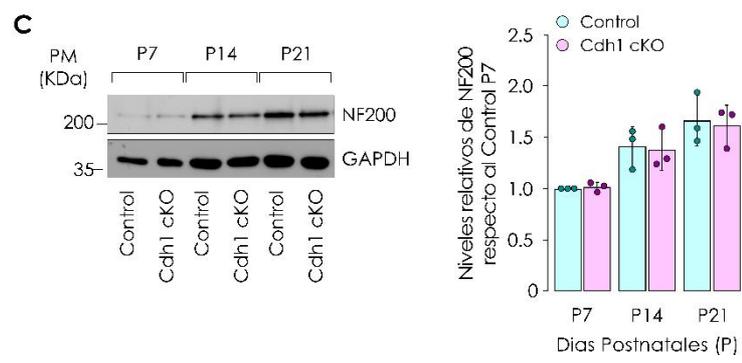
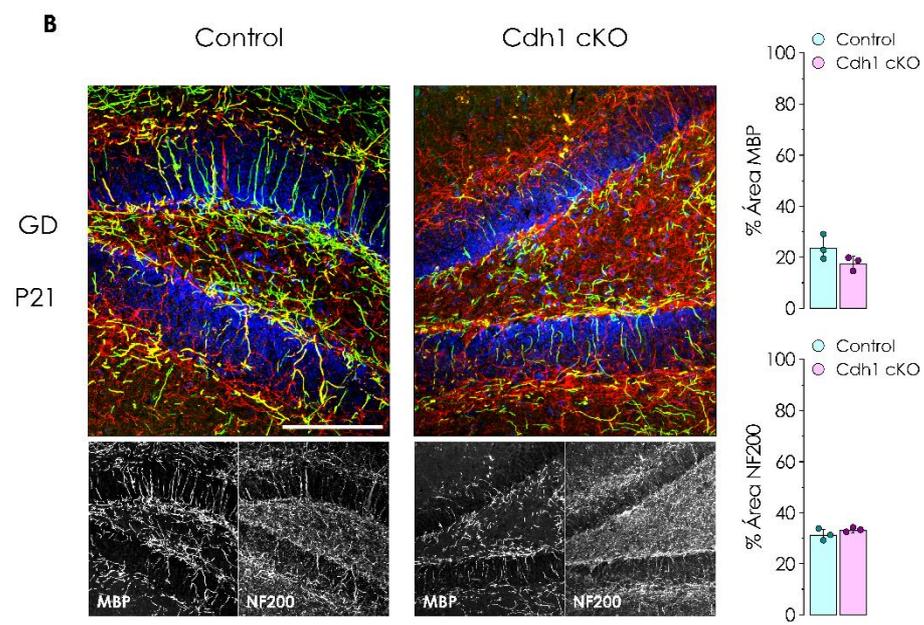
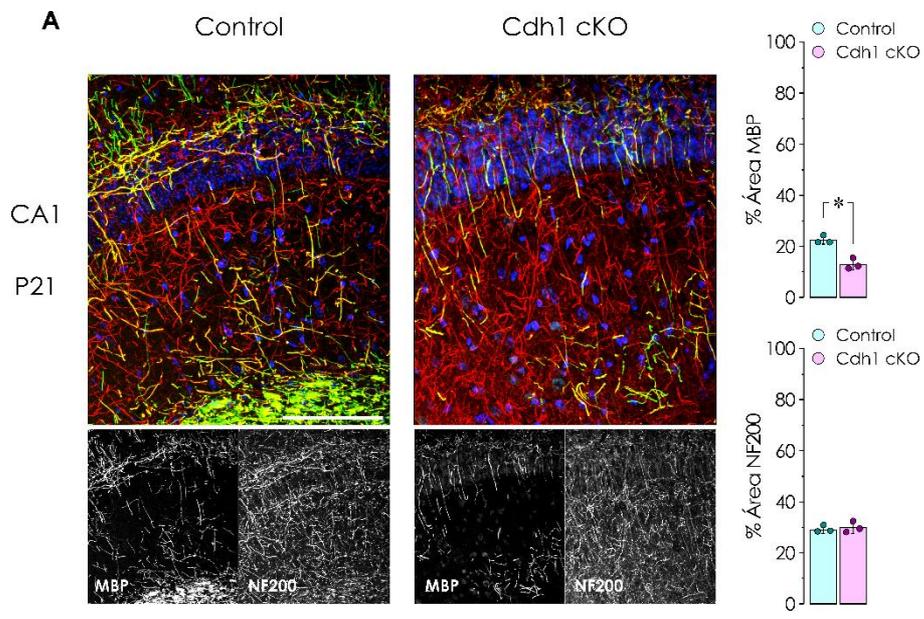


Figura 18. La falta de Cdh1 reduce los niveles de mielina manteniendo los axones sin modificaciones. Imágenes representativas de microscopía confocal de la proteína MBP (verde) y NF200 como marcador axónico (rojo), realizadas en la CA1 del hipocampo **(A)** y el giro dentado **(B)**. Barra escala: 100 μ m. La cuantificación se normalizó frente al Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student. **(C)** Inmunodetección de NF200 en extractos totales del encéfalo a distintas edades de estudio. La cuantificación se normalizó frente Control P7 y se empleó GAPDH como control de carga. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

3. Cdh1 REGULA LA PROLIFERACIÓN DE OPCs, PERO NO ES IMPRESCINDIBLE PARA SU DIFERENCIACIÓN A OLIGODENDROCITOS

Hasta el momento, hemos descrito que la ausencia de Cdh1 retrasa la mielinización durante el desarrollo postnatal, sin afectar a la supervivencia neuronal en la corteza parietal y la red axonal. Dado el papel esencial que tiene APC/C-Cdh1 en la salida del ciclo celular y la diferenciación celular (Chang et al., 2014b; Qiao et al., 2010), quisimos estudiar si la falta de Cdh1 altera el proceso de oligodendrogénesis durante el desarrollo postnatal, y consecuentemente, promueve procesos de hipomielinización. Para ello, se analizó la población oligodendroglial y la diferenciación de los OLs en nuestro modelo experimental.

3.1. La falta de Cdh1 reduce el número de oligodendrocitos en el cuerpo calloso

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de la población de oligodendrocitos (OLs) en el cuerpo calloso, a distintas edades del desarrollo postnatal. Los OLs se visualizaron mediante inmunohistoquímica frente a Olig2, marcador específico de linaje oligodendroglial, por lo que detecta la población independientemente de su estado de diferenciación o maduración. Se observó que, en las

primeras etapas del desarrollo (P7), ambos genotipos presentaron porcentajes similares de células Olig2 positivas (**Figura 19**). Sin embargo, en etapas posteriores (P14 y P21), la falta de Cdh1 disminuye el porcentaje de células Olig2+, especialmente a P21, en el cuerpo caloso. Durante el desarrollo postnatal, la expansión de la población oligodendroglial es clave para establecer contactos con los axones e inducir su diferenciación (Ozgen et al., 2016). Los ratones Cdh1 cKO no presentaron un incremento en el número de oligodendrocitos a medida que transcurría el desarrollo, sino que este valor se mantuvo estable en referencia a P7. Sin embargo, el porcentaje de células Olig2+ en la corteza (**Figura 15**) fue similar entre ambos genotipos a P21. Hay que destacar que el porcentaje de oligodendrocitos en el cuerpo caloso (**Figura 19**) es muy superior al de la corteza cerebral (**Figura 15**), lo que podría explicar el diferente efecto de Cdh1 en ambas zonas cerebrales. Por tanto, Cdh1 es importante para la expansión de los oligodendrocitos que se produce en el cuerpo caloso, a partir de la primera semana postnatal.

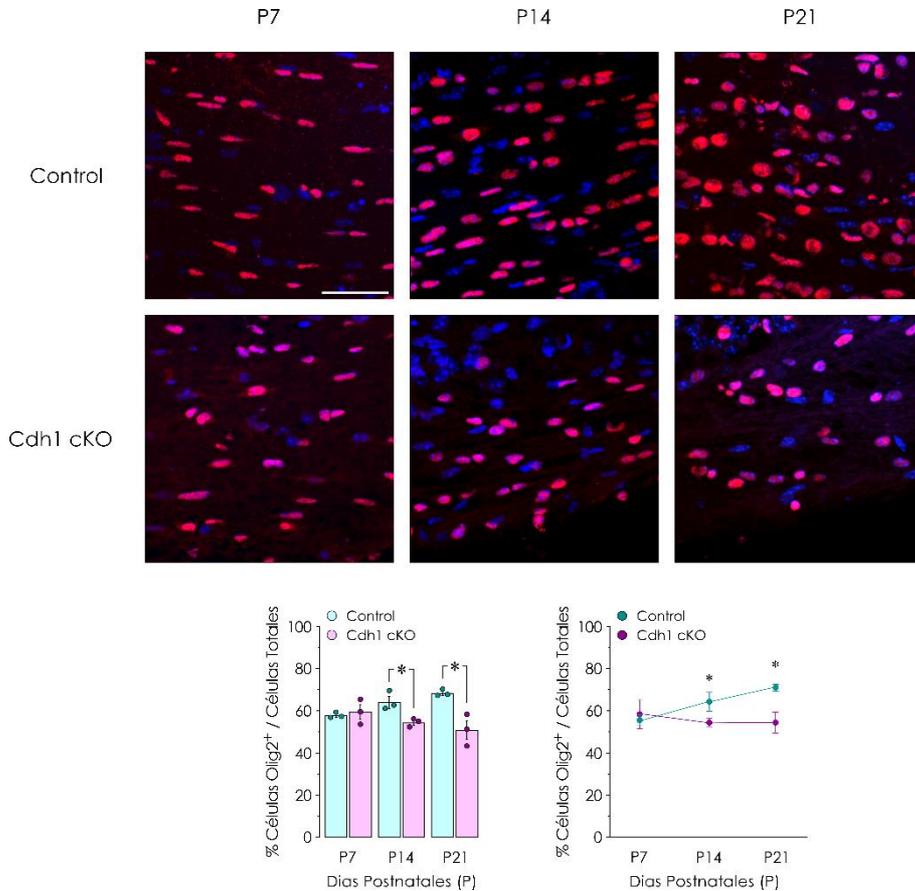


Figura 19. La falta de Cdh1 previene el incremento postnatal en el número de oligodendrocitos en el cuerpo calloso. Imágenes de proyecciones máximas tras la tinción con el marcador de linaje oligodendroglial Olig2 (rojo), realizadas en el cuerpo calloso. Barra escala: 50 μ m. Las cuantificaciones se normalizaron frente a su Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

3.2. La falta de Cdh1 incrementa la proliferación de OPCs y altera su morfología

Posteriormente, analizamos la población de OPCs en el cuerpo callosos, a diferentes días postnatales. Para esclarecer si la proliferación de los OPCs podría estar alterada en nuestro modelo, determinamos la proliferación a P7, punto en el que los OPCs proliferan y empieza la diferenciación en el cuerpo calloso (Sengottuvel et al., 2023; Zhang et al.,

2018) Los animales se inyectaron intraperitonealmente con el marcador de fase S, BrdU (5-bromo-2-desoxiuridina) (Matiašová et al., 2014). Se realizaron inmunohistoquímicas frente PDGFR α , proteína que detecta los OPCs (Sengottuvel et al., 2023). Como se observa en la **Figura 20**, los animales Cdh1 cKO presentaron un incremento en el número de OPCs (PDGFR α + BrdU+, respecto a los animales Control. Estos resultados indican que Cdh1 promueve la proliferación de OPCs, que se produce en la primera semana de vida. Cabe destacar que APC/C-Cdh1 coordina la progresión de la fase G1 a la fase S (Peters, 2006a). Es más, la falta de Cdh1 en los precursores neurales embrionarios alarga la fase S de las células, promoviendo el estrés replicativo y la muerte por apoptosis, mediada por p53, en los progenitores neuronales (Delgado-Esteban et al., 2013a) Así, la posible apoptosis de OPCs podría explicar el mantenimiento en el número de células Olig2+ (**Figura 19**) durante las primeras semanas postnatales, a pesar de que estas células tienen mayor incorporación de BrdU (**Figura 20**). Sin embargo, resultados preliminares no evidenciaron un incremento en la apoptosis de los OPCs, ya que la inmunodetección de la caspasa 3 activa en el cuerpo calloso fue similar en ambos genotipos. En cualquier caso, son resultados preliminares y necesitamos estudiarlo en profundidad en el futuro.

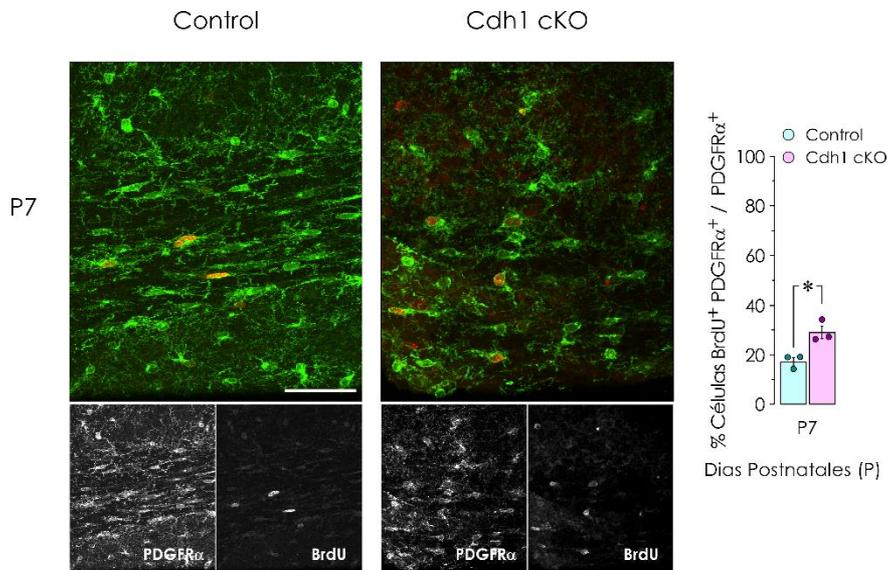


Figura 20. La ausencia de Cdh1 promueve la proliferación de los OPCs a P7. Fotografías de microscopía confocal del marcador de linaje oligodendroglial Olig2 (rojo), realizadas en el cuerpo caloso. Barra escala: 50 μ m. Barra escala: 50 μ m. La cuantificación se normalizó frente a su Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

Sorprendentemente, la morfología de los OPCs no presentó la forma bipolar característica de los OPCs (Binamé et al., 2013b) en el animal Cdh1 cKO a P21. En la **Figura 21**, se muestra la morfología de los OPCs de las principales áreas de estudio (cuerpo caloso, corteza e hipocampo) a diferentes edades del desarrollo (P7, P14 y P21). A P7, la morfología celular es muy parecida en ambos genotipos, en las áreas cerebrales analizadas. Sin embargo, a P14 empiezan a aparecer diferencias morfológicas, especialmente en el cuerpo caloso, siendo mucho más evidentes a P21. Los OPCs de los ratones Cdh1 cKO presentaron un aumento del tamaño celular y de la complejidad de las ramificaciones. Estos cambios morfológicos de los OPCs, de tipología estrellada, son característicos de la respuesta frente a un daño (Chacon-De-La-Rocha et al., 2020). En un modelo murino de enfermedad de Alzheimer se ha demostrado que el aumento del volumen celular y de las ramificaciones son síntomas del daño celular y/o entrada de los OPCs en senescencia (Vanzulli et al., 2020). Es más, durante el envejecimiento, los OPCs pierden

su capacidad regenerativa y no responden a señales que inducen su diferenciación a OLs, lo que está relacionado con la hipomielinización del cerebro anciano (Neumann et al., 2019; Sim et al., 2002). La falta de Cdh1 provoca estrés replicativo y daño en el ADN (Delgado-Esteban et al., 2013; Eguren et al., 2013; Garcí-Higuera et al., 2008), lo que resulta en senescencia (Gioia et al., 2023; Luo et al., 2023) y podría afectar a la población de OPCs y su diferenciación a OLs maduros y mielinizantes. Para estudiar esta hipótesis, en primer lugar, determinamos el porcentaje de OPCs y de OLs maduros durante el periodo postnatal.

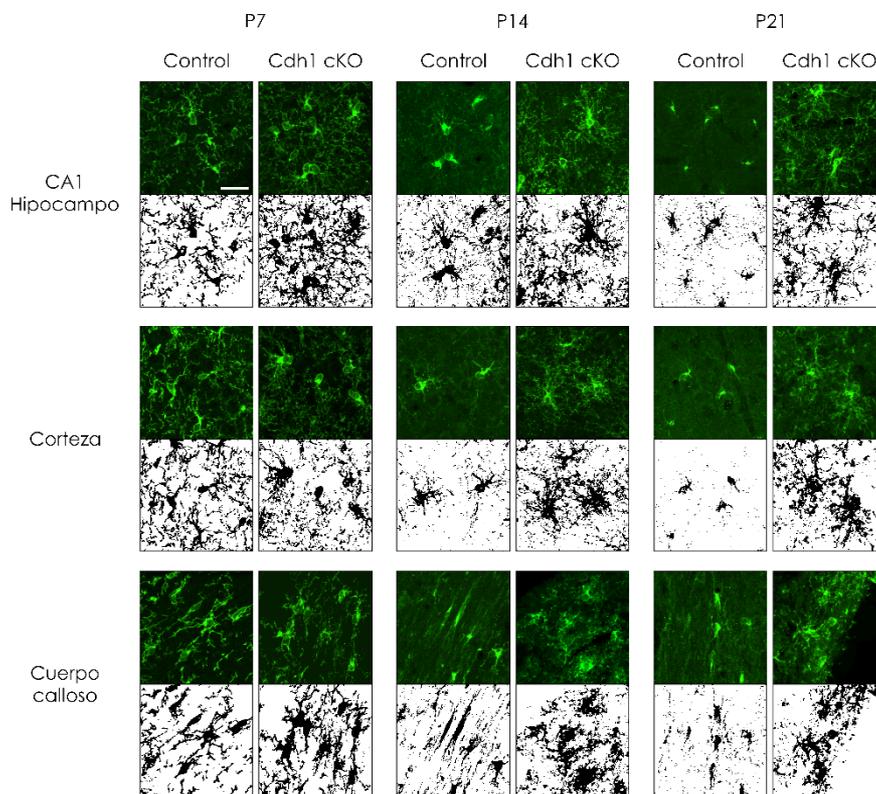


Figura 21. La inactivación del complejo induce la senescencia de los OPCs. Imágenes representativas de microscopía confocal, y sus correspondientes negativos, de los precursores de oligodendrocitos marcados con PDGFR α (verde), realizadas en la CA1 del hipocampo, en la corteza y el cuerpo calloso a distintas edades del desarrollo postnatal. Barra escala: 25 μ m.

Mediante co-inmunohistoquímicas frente a PDGFR α y Olig2, analizamos el porcentaje de OPCs dentro del total de la población oligodendroglial. No se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos a P7 (**Figura 22**), edad en la que previamente se describió un aumento de los OPCs en fase S (**Figura 20**). A P14 detectamos un ligero incremento, que fue significativo a los P21 en los animales Cdh1 cKO, respecto a los Control. Es más, la disminución en el porcentaje de OPCs durante el desarrollo postnatal fue más acusada en los animales Control que en los Cdh1 cKO (**Figura 22**), lo que concuerda con el incremento de la proliferación. Estos resultados confirman que APC/C-Cdh1 está modulando la proliferación de los OPC promoviendo la expansión del linaje oligodendroglial durante las primeras etapas del desarrollo postnatal.

A continuación, los cambios en los niveles de OPCs se confirmaron mediante rt-qPCR en los extractos totales de cerebro. Ambos genotipos mostraron niveles similares de ARN mensajero de Olig2 y PDGFR α a P7, mientras que a P21 los animales Cdh1 cKO mostraron mayor expresión del marcador específico de OPC (**Figura 23**). Es más, los niveles de PDGFR α frente a Olig2 se mantuvieron elevados, indicando que la ausencia de Cdh1 aumenta los OPC del cuerpo calloso a edades tardías del desarrollo postnatal.

Posteriormente, y teniendo en cuenta la morfología de los OPCs en los animales Cdh1 cKO a P21, compatible con una entrada en senescencia, analizamos la capacidad proliferativa de estas células, mediante la co-detección de BrdU y PDGFR α . No se detectaron precursores en fase S en ambos genotipos a P21, indicando que los OPCs no están replicando (**Figura 24**). Por tanto, la proliferación de los OPCs no es la única causa del incremento de estas células, sino que probablemente es la consecuencia de la entrada en senescencia de los OPC y, con ello, su incapacidad para diferenciar a OLs.

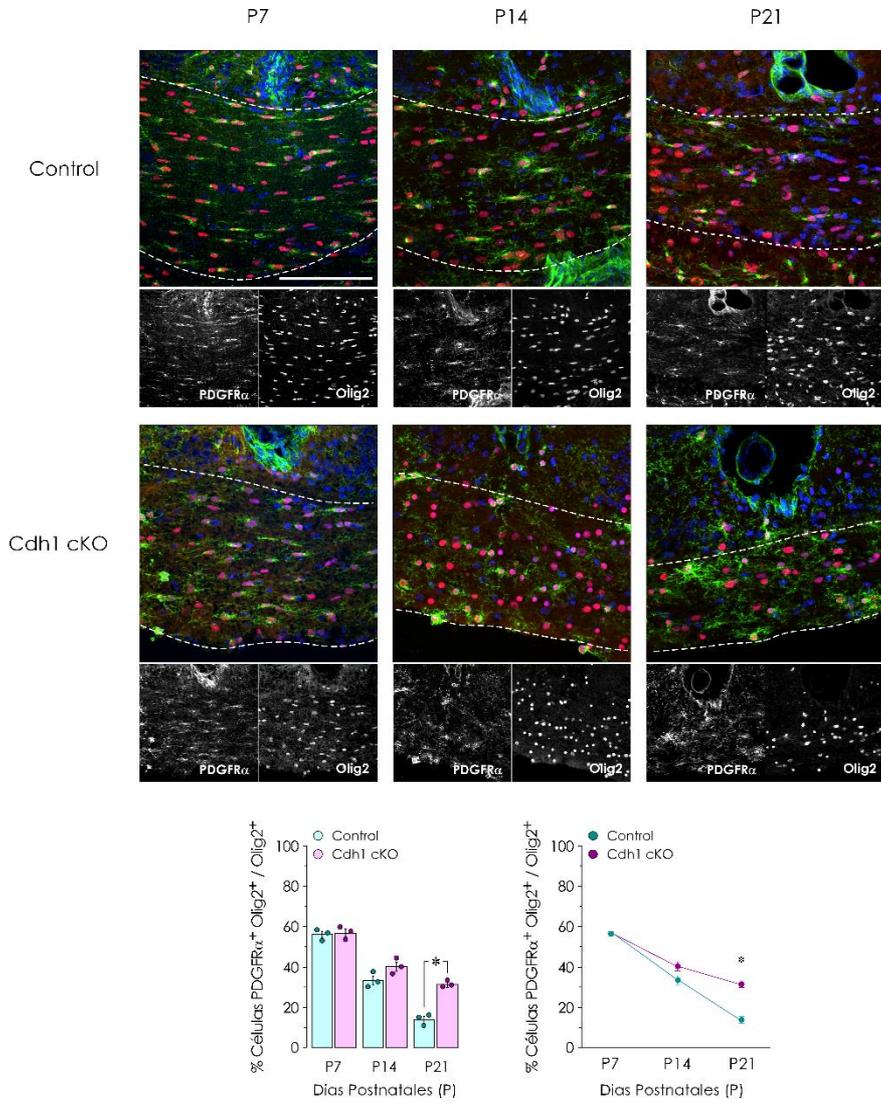


Figura 22. La falta de Cdh1 aumenta la población de OPCs. La imagen de microscopía confocal muestra los OPCs marcados con PDGFR α (verde) y el total de los oligodendrocitos marcados con Olig2 (rojo), en el cuerpo calloso a diferentes etapas postnatales. Barra escala: 50 μ m. La cuantificación se normalizó frente a su Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

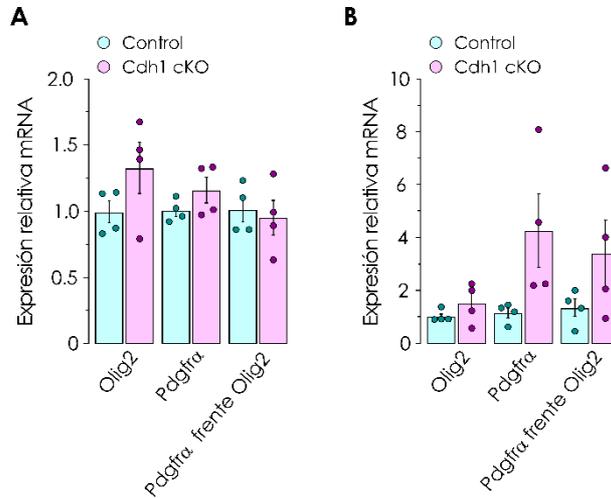


Figura 23. La ausencia de Cdh1 incrementa la población de OPCs en la etapa postnatal. Análisis de la expresión relativa de Olig2 y PDGFR α , mediante rt-qPCR, a P7 **(A)** y a P21 **(B)**. Se utilizó GAPDH como control interno de expresión. Los resultados se normalizaron frente al Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

Hasta el momento, nuestros resultados demuestran que APC/C-Cdh1 participa en la proliferación de los OPCs durante la primera semana postnatal, promoviendo la expansión del linaje oligodendroglial. Así, la falta de Cdh1 promueve la entrada de los OPCs en la fase S del ciclo celular, como ya se ha descrito en otros precursores, como los progenitores neurales, que sufren estrés replicativo (Delgado-Esteban et al., 2013b). Es más, los OPCs, especialmente a P21, parecen senescentes, lo que podría prevenir la diferenciación a OLS y, con ello, inducir hipomielinización, como la observada en los animales Cdh1 cKO **(Figura 14)**.

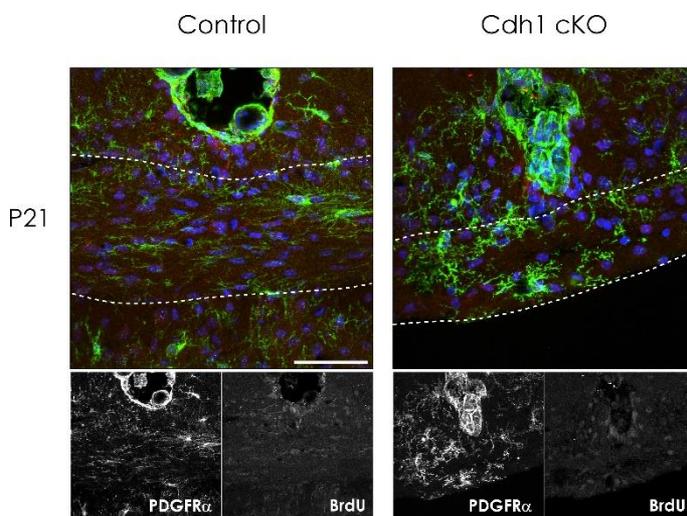


Figura 24. Los OPCs no son proliferativos a 21 días de vida postnatal. Microfotografías confocales de precursores de oligodendrocitos tras la tinción con PDGFR α (verde) y el marcador de fase S BrdU (rojo). Barra escala: 50 μ m

3.3. APC/C-Cdh1 no es imprescindible para la diferenciación postnatal de los oligodendrocitos

Como se ha mencionado en la introducción, durante la oligodendrogénesis, los OPCs proliferan y adquieren características de pre-oligodendrocitos, los cuales diferencian y se transforman en oligodendrocitos inmaduros. A continuación, los oligodendrocitos maduran y empiezan a sintetizar proteínas de la vaina de mielina, convirtiéndose en oligodendrocitos mielinizantes (Bercury & Macklin, 2015; Bergles & Richardson, 2016; Emery, 2010; W. Huang et al., 2020). Dado que la falta de Cdh1 incrementa la población de OPCs a partir de P14, nuestro siguiente objetivo fue evaluar el posible efecto de Cdh1 sobre la diferenciación de estos precursores a OLs maduros mielinizantes. Para ello, se co-inmunodetectaron las proteínas CC1, marcador de oligodendrocitos maduros mielinizantes, y Olig2, marcador de linaje. La diferenciación de los OPCs empieza a P7 y su crecimiento es exponencial hasta estabilizarse a P21 (Barateiro & Fernandes, 2014; Zhang et al., 2018).

Como muestra la **Figura 25**, se produjo un incremento de OLs maduros desde P7 en ambos genotipos, si bien observamos un leve retraso en los Cdh1 cKO, comparado con los animales Control. Es importante resaltar que la falta de Cdh1 no previno la diferenciación de los OPCs a OLs maduros y mielinizantes, por lo que Cdh1 no parece ser imprescindible para la oligodendrogénesis postnatal.

Con el fin de profundizar en el estudio de la diferenciación de los OPCs en ausencia de Cdh1, se inyectaron animales a P7 y P8 con BrdU, que se inmunodetectó a P14, junto con CC1. Esta estrategia nos permitió identificar la población de OPCs a P7 que proliferan y, posteriormente, a P14 diferencian a OLs mielinizantes (**Figura 26**). Como muestra la **Figura 26A**, la falta de Cdh1 no previno la diferenciación de los OPCs, dado que no observaron diferencias en los oligodendrocitos maduros mielinizantes doblemente positivos para CC1 y BrdU. El porcentaje de OPCs BrdU+ a P14 fue aproximadamente el mismo que se detectó a P7 (**Figura 26B**).

Nuestros resultados demuestran que APC/C-Cdh1 coordina la proliferación de los precursores de oligodendrocitos. El incremento de OPCs en fase S en los animales Cdh1 cKO evidencia que tiene una importante función en la proliferación de estos precursores, como ya se demostró en los progenitores neuronales [Delgado-Esteban, 2023; Eguren, 2023]. Sin embargo, Cdh1 no parece ser esencial para la diferenciación y maduración de los oligodendrocitos, ya que esta se produce incluso en ausencia del cofactor.

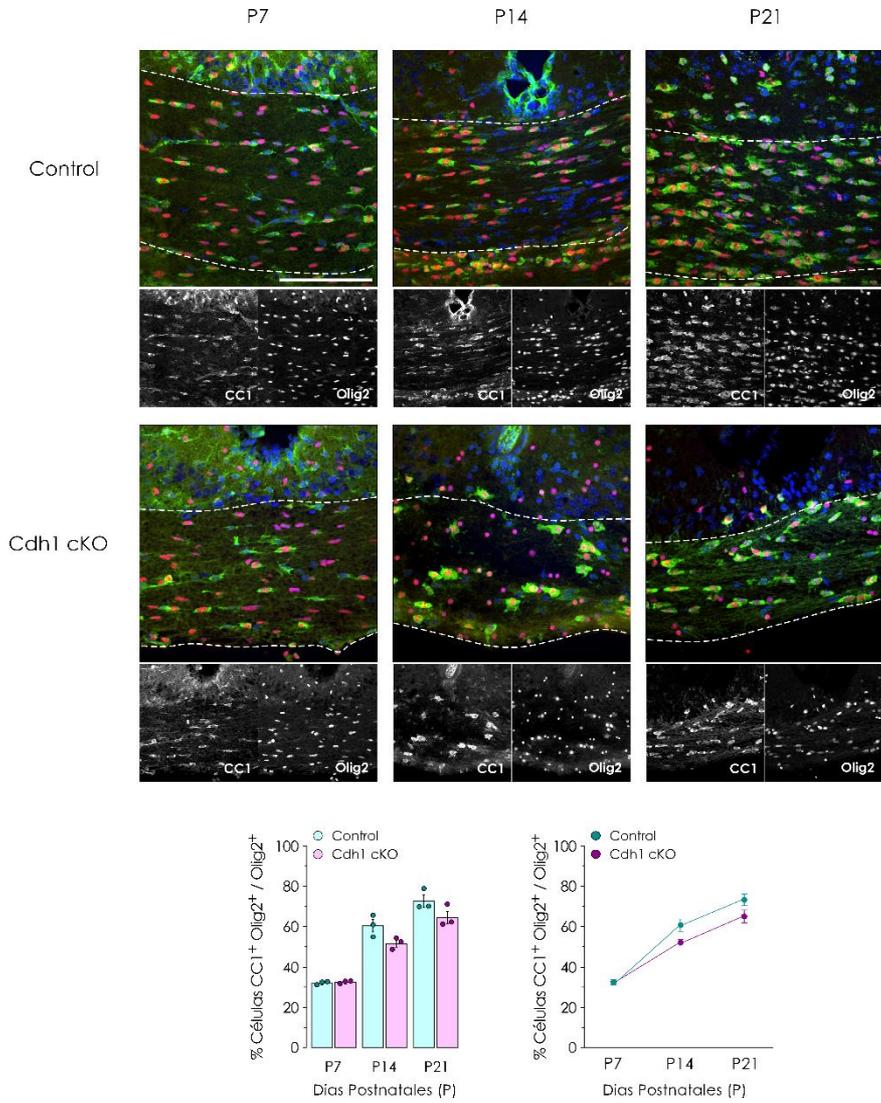


Figura 25. Cdh1 no es esencial para la diferenciación de los oligodendrocitos. Imágenes de las proyecciones máximas de los oligodendrocitos maduros tras la tinción con la proteína CC1 (verde) y el marcador de linaje oligodendroglial Olig2 (rojo), realizadas en el cuerpo caloso a diferentes etapas postnatales. Barra escala: 100 μ m. La cuantificación se normalizó frente a su Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

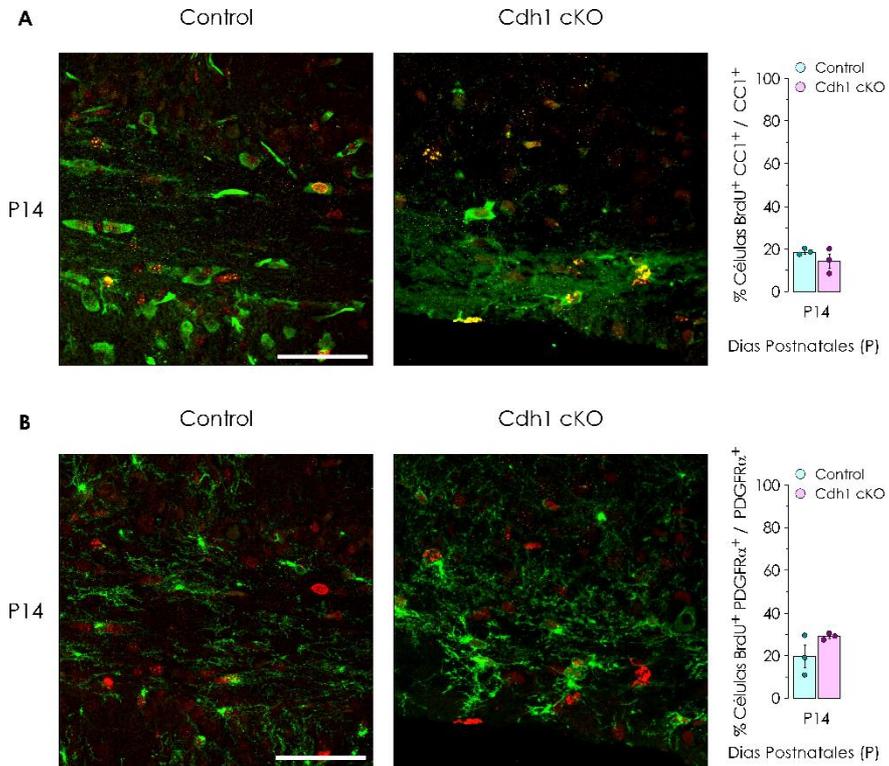


Figura 26. La ausencia de Cdh1 no previene la diferenciación de los oligodendrocitos. Fotografías de microscopía confocal realizadas en el cuerpo calloso a 14 días de vida postnatal. **(A)** Imágenes de los oligodendrocitos maduros marcados con CC1 (verde) y el marcador de fase S BrdU (rojo). **(B)** Imágenes de OPCs tras la tinción con PDGFR α (verde) y BrdU (rojo). Barra escala: 50 μ m. La cuantificación se normalizó frente a su Control. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

4. APC/C-Cdh1 ES ESENCIAL PARA LA CORRECTA FORMACIÓN DE LA VAINA DE MIELINA

Los resultados descritos hasta el momento, nos han permitido descartar que la hipomielinización causada por la ausencia de Cdh1 sea debida a la falta de OLs maduros y mielinizantes. Por tanto, nuestro siguiente objetivo fue analizar la estructura de la vaina de mielina.

La interacción entre axón y oligodendrocitos es esencial para promover la mielinización (Stassart et al., 2018). Así, analizamos la vaina de mielina en los axones, mediante co-inmunodetección de NF200 y MBP por microscopía de alta magnificación y deconvolución.

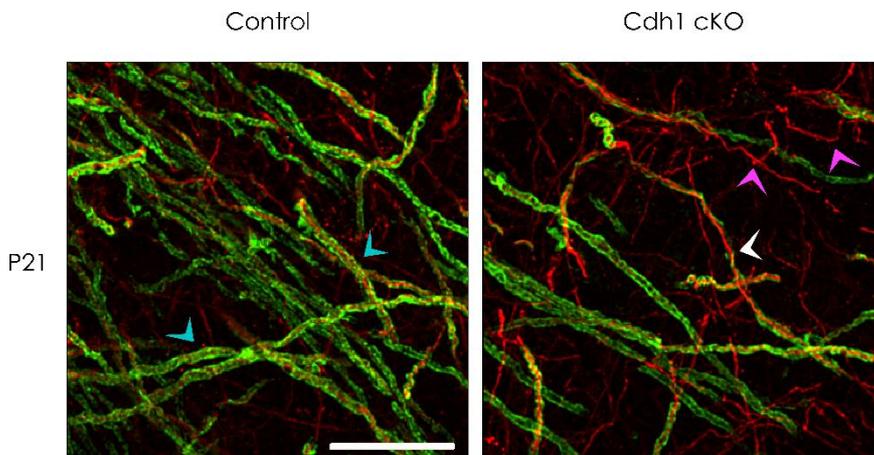


Figura 27. La falta de Cdh1 altera la mielinización de los axones. Imágenes de proyecciones máximas deconvolucionadas tras la tinción de la mielina con MBP (verde) y el marcador axonal NF200 (rojo) en la corteza de animales a P21. Barra escala: 10µm

En la **Figura 27** se observa que los animales Control presentan la mayoría de los axones mielinizados, a juzgar por la co-localización de NF200 y MBP (flechas cian). Sin embargo, gran parte de los axones de los animales Cdh1 cKO estaban desmielinizados, o bien presentaban la vaina de mielina alterada, con roturas (flechas blancas). Es esencial destacar, que en los animales Cdh1 cKO se observó un mayor número de axones completamente desnudos (flechas rosas). Por tanto, Cdh1 es esencial para la mielinización de los axones tras el nacimiento.

4.1. La ausencia de Cdh1 reduce el espesor de la mielina y el número de axones mielinizados

Nuestro siguiente paso fue analizar la ultraestructura de la vaina de mielina mediante microscopía electrónica a P21. Se sabe que, en etapas tardías del desarrollo postnatal, los axones de mayor calibre están recubiertos de mielina, bien empaquetada y compactada (From et al., 2014). El g-ratio es una medida que permite relacionar el diámetro total del axón con el espesor de la mielina (From et al., 2014), es decir, se mide el espesor de la vaina y se realiza el ratio frente al diámetro total del axón (axón y vaina de mielina). Así, valores del g-ratio cercanos a 1 equivalen al estrechamiento de la vaina de mielina (Paus & Toro, 2009). El g-ratio fue significativamente mayor en los animales deficientes en Cdh1 (**Figura 28A**), indicando que el espesor de la mielina es inferior con relación al diámetro del axón. Estos hallazgos demuestran que la falta de Cdh1 inhibe el correcto empaquetamiento de los axones afectando la integridad de los axones y la transmisión sináptica.

Además, los animales Cdh1 cKO duplicaron el número de axones no mielinizados, y sufrieron un cambio de distribución en los axones con un diámetro superior a 800nm (**Figura 28C**). Los axones de mayor diámetro requieren una mayor velocidad de conducción de la señal eléctrica, y por tanto, requiere el correcto aislamiento de la mielina (Costa et al., 2018). Los oligodendrocitos carentes de Cdh1 no mielinizan axones de gran diámetro, afectando directamente a la velocidad de la transmisión sináptica.

Estos resultados demuestran que la falta de Cdh1 altera el empaquetamiento de la vaina de mielina e induce hipomielinización, a juzgar por el incremento en el número de axones no mielinizados.

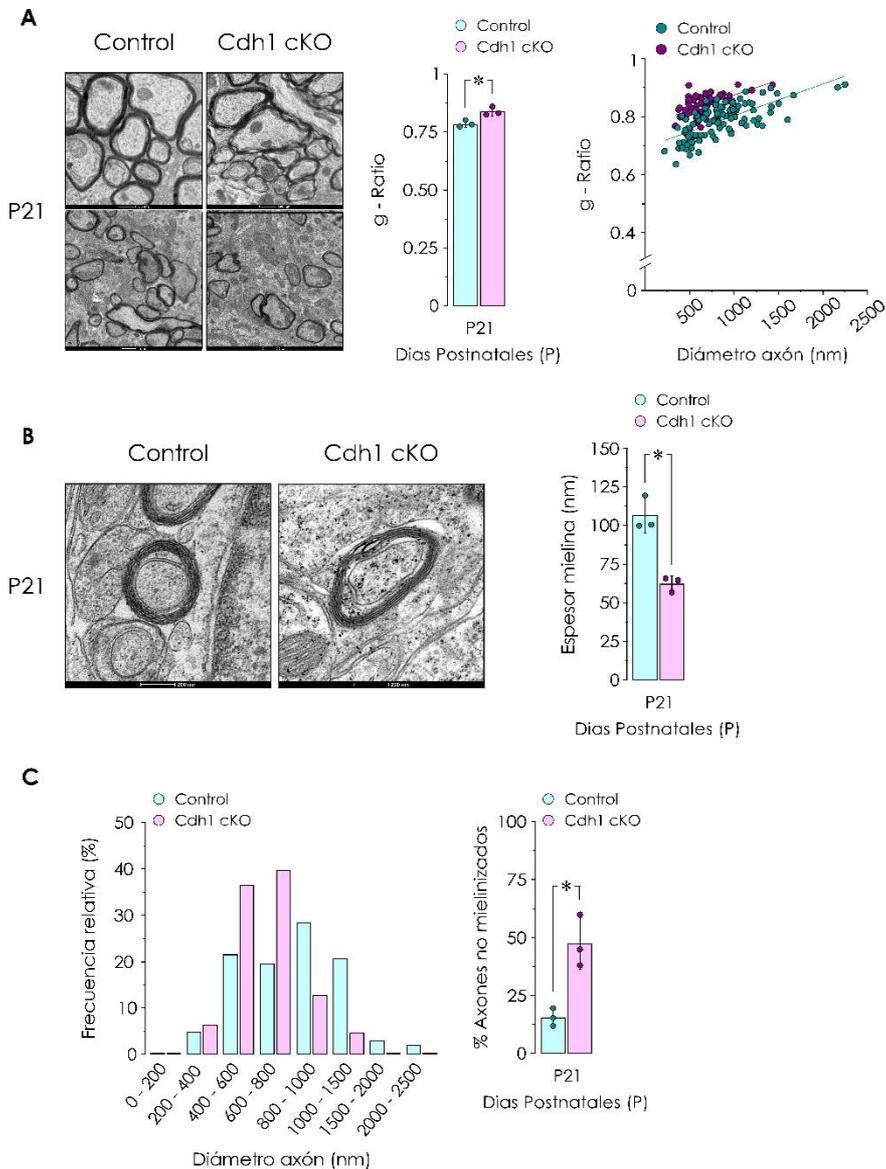


Figura 28. La ausencia de Cdh1 reduce el espesor de la mielina y el número de axones mielinizados. Microfotografías de microscopía electrónica a P21. **(A)** Nanofotografías y gráficos de las cuantificaciones del g-ratio en ambos genotipos. Barra escala: 500nm (superior)/ 1µm (inferior). Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. **(B)** Imágenes representativas del análisis del espesor de la vaina en axones mielinizados. Barra escala: 200nm. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. **(C)** Análisis de los axones mielinizados en función de su calibre, y porcentaje de axones no mielinizados por genotipo. Los resultados se expresaron como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Student.

4.2. La ausencia de Cdh1 desestructura la vaina de mielina

Las microfotografías de los axones mielinizados en los ratones Cdh1 cKO mostraron alteraciones en el empaquetamiento y lesiones en la vaina de mielina de características similares a las presentes en la alteración denominada "axon swelling" (Payne et al., 2012a). Estas lesiones, en su gran mayoría, mostraban vacuolaciones de la mielina, hasta el punto de provocar una rotura evidente de la vaina. Como muestra en la **Figura 29**, los ratones Cdh1 cKO presentaron más del doble de axones con lesiones en la mielina, indicando que la falta de Cdh1 no sólo reduce el número de axones mielinizados, sino que estos presentaron una desestructuración y daño de la vaina de mielina.

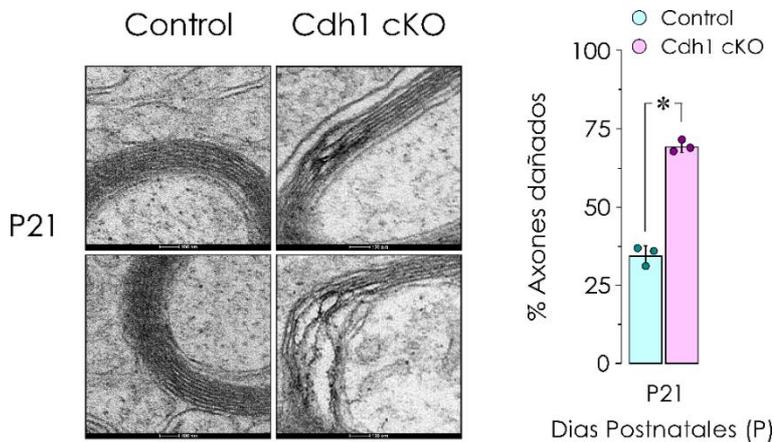


Figura 29. La falta de Cdh1 desestructura la vaina de mielina. Microfotografías de microscopía electrónica del hipocampo a P21. Se cuantificó el porcentaje de axones que presentaban lesiones en la vaina de mielina. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 3 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Barra escala: 100 nm. Prueba t de Student.

Por tanto, APC/C-Cdh1 regula la mielinización postnatal, de manera que Cdh1 es esencial para la correcta formación y compactación de la vaina de mielina alrededor de los axones neuronales y, con ello, la transmisión del impulso nervioso. Así, una disfunción de la ligasa, provoca hipomielinización de axones grandes, lo que causa discapacidad

intelectual y alteraciones motoras, entre otras alteraciones neurológicas [Swanson, 2019, 33], como ocurre en pacientes que portan mutaciones en *Cdh1* (Manivannan et al., 2022; Rodríguez et al., 2019a).

5. APC/C-*Cdh1* ES ESENCIAL PARA EL MANTENIMIENTO DE LA HOMEOSTASIS LIPÍDICA EN EL CEREBRO

La composición lipídica de la bicapa de mielina es un factor crítico para el empaquetamiento de la vaina (Mu et al., 2019). La vaina de mielina está compuesta principalmente por lípidos y proteínas específicas de la mielina, que deben encontrarse en la proporción correcta para ejercer su función de aislamiento (Barnes-Vélez et al., 2023; Ozgen et al., 2016). Dada la importancia de los lípidos en la formación y mantenimiento de la vaina de mielina (Davis et al., 2020; Ozgen et al., 2016), realizamos un estudio metabolómico no dirigido en extractos cerebrales de animales P21 Control y *Cdh1* cKO.

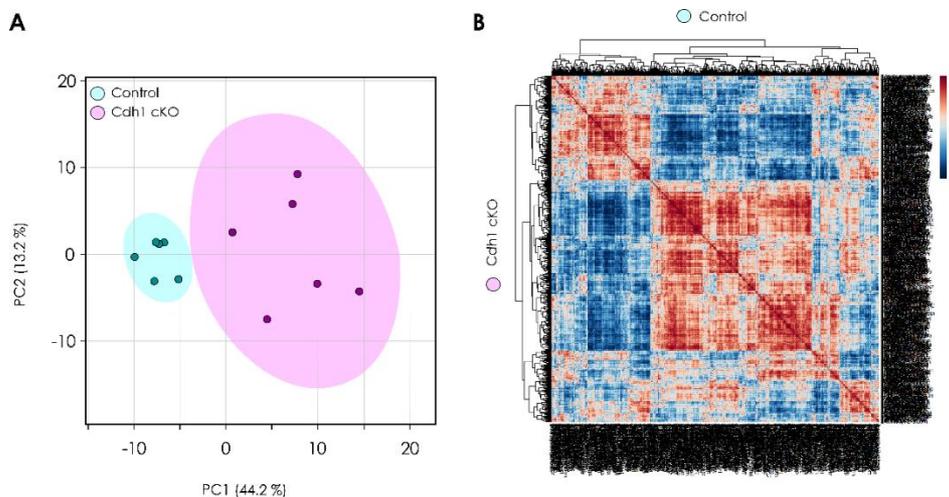


Figura 30. La ausencia de *Cdh1* altera el metabolismo cerebral en etapas tardías del desarrollo postnatal. (A) El análisis de los componentes principales indica la presencia de dos poblaciones claras y bien diferenciadas, sugiriendo diferencias relevantes entre los dos genotipos estudiados. **(B)** Matriz de correlación de todos los metabolitos detectados en el estudio. Los colores rojo y azul reflejan correlaciones positivas y negativas respectivamente, que a su vez indican la direccionalidad de la correlación.

El estudio detectó 751 metabolitos totales. El análisis no supervisado de componentes principales (PCA), representado en la **Figura 30A**, mostró dos poblaciones completamente independientes correspondientes a cada genotipo, sugiriendo importantes diferencias en cuanto a la abundancia de metabolitos totales entre ambas condiciones.

La matriz de correlación de la **Figura 30B** sugiere la presencia de interacciones entre los 751 metabolitos analizados. Los tonos rojizos reflejan interacciones positivas entre metabolitos, formando *clusters*, posiblemente por pertenecer a una misma vía metabólica o rutas estrechamente ligadas. Dado que el objetivo principal de este estudio era profundizar en los mecanismos responsables de la hipomielinización de los animales Cdh1 cKO, nos centramos en los metabolitos lipídicos, pero no se profundizó en la correlación entre rutas metabólicas.

Para analizar posibles cambios en metabolitos lipídicos entre genotipos, se representaron los 375 metabolitos lipídicos detectados en función de su abundancia relativa y significatividad frente a los animales Control. El *volcano plot* de la **Figura 31A** muestra un total de 159 metabolitos lipídicos significativamente alterados (p -valor $<0,05$), de los cuales 31 se encuentran incrementados mientras que 129 están reducidos. Estos resultados sugieren que la ausencia de Cdh1 modifica de manera negativa la composición lipídica del encéfalo, dado que la mayoría de los metabolitos alterados poseen niveles inferiores comparándolos con el animal Control. Este efecto se puede observar en el *heatmap* (**Figura 31B**), en el que se han representado los metabolitos significativamente alterados en los 6 animales estudiados por genotipo.

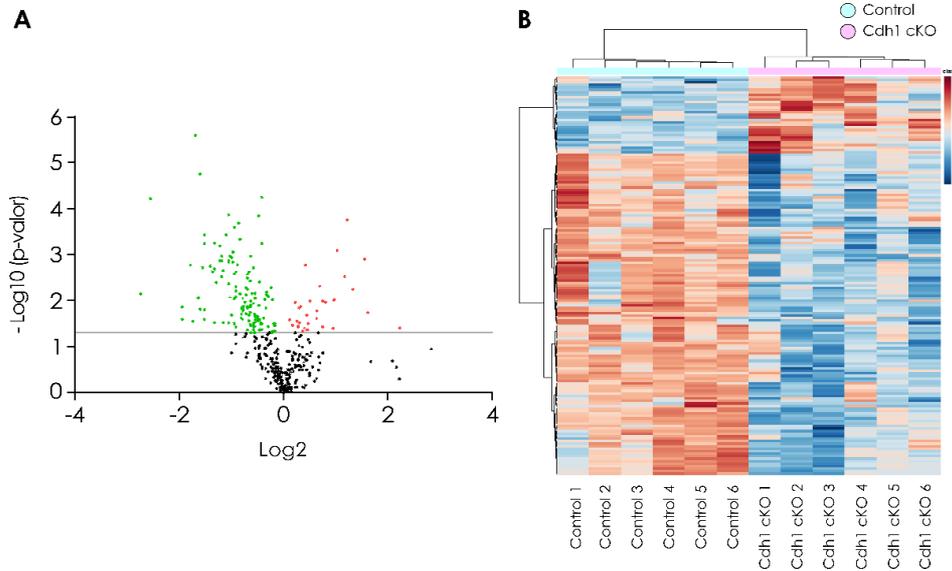


Figura 31. La falta de Cdhl altera la composición lipídica del encéfalo. **(A)** Volcano plot de los metabolitos lipídicos, representando la abundancia relativa a los animales Control, frente a la significatividad relativa (p -valor $<0,05$). **(B)** Heatmap de los metabolitos lipídicos significativamente alterados en los 6 animales por genotipo analizados. Prueba t de Welch.

A continuación, se analizaron cuáles eran las vías metabólicas que contenían más metabolitos significativamente alterados en los animales Cdhl cKO, es decir, se determinó el enriquecimiento de las rutas metabólicas. Este parámetro, es el resultado de la siguiente ecuación (Wieder et al., 2021):

$$Enrichment = \frac{\frac{k}{m}}{\frac{(n-k)}{(N-m)}}$$

k = metabolitos significativamente alterados de una ruta
 m = Metabolitos totales detectados de una ruta
 n = Metabolitos significativamente alterados totales
 N = Metabolitos totales detectados

Si el enriquecimiento de una ruta es superior a 1, contiene más metabolitos con una diferencia estadísticamente significativa comparado con el Control. Es más, cuanto mayor sea el enriquecimiento, más alterada se encuentra la ruta y, por tanto, se considerará la vía metabólica susceptible de estudio.

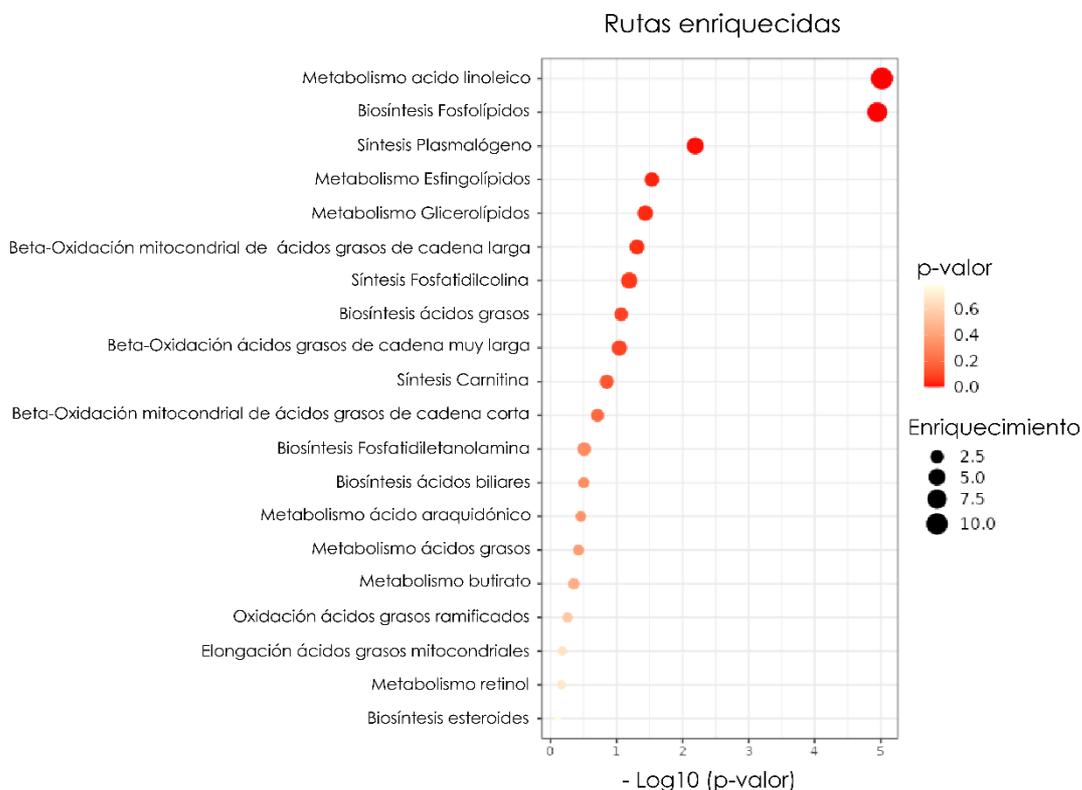


Figura 32. La ausencia de Cdh1 altera rutas importantes del metabolismo lipídico. El metabolismo del ácido linoleico y la biosíntesis de fosfolípidos, incluyendo los plasmalógenos, esfingolípidos y glicerolípidos, son las rutas metabólicas más alteradas en los animales Cdh1cKO. Prueba t de Welch.

Si nos fijamos en la **Figura 32**, podemos observar que las vías relacionadas con el metabolismo del ácido linoleico y la biosíntesis de los fosfolípidos fueron las rutas más enriquecidas en el estudio de los metabolitos lipídicos de los animales carentes de Cdh1. Las siguientes tres vías con valores de enriquecimiento elevados fueron la síntesis de plasmalógenos, el metabolismo de esfingolípidos y glicerolípidos, todas ellas incluidas dentro de las rutas metabólicas de los fosfolípidos, componentes esenciales de la mielina [CITA].

Estos resultados revelan que el metabolismo de los fosfolípidos se encuentra altamente modificado en nuestro modelo experimental, y por tanto, las vías afines son susceptibles de un estudio exhaustivo.

5.1. La falta de Cdh1 reduce los componentes lipídicos de la vaina de mielina

El cerebro es el órgano con mayor proporción de lípidos respecto al resto del cuerpo. Estos lípidos forman los bloques esenciales para establecer las redes cerebrales, participando en procesos críticos, como la sinaptogénesis y la mielinización. El contenido lipídico del cerebro aumenta exponencialmente después del nacimiento (Oliveira et al., 2022), coincidiendo con el proceso de mielinización (van Tilborg et al., 2018). Por lo tanto, analizar los metabolitos lipídicos esenciales para la estructura de la vaina de mielina, nos permitirá realizar una primera aproximación en el estudio de la formación y composición de la mielina.

Como se mencionó en el apartado 2.4.1, la vaina de mielina está compuesta principalmente por colesterol, galactosilceramidas y fosfolípidos, siendo los glicerofosfolípidos y los esfingolípidos los lípidos mayoritarios (Davis et al., 2020; Ozgen et al., 2016). Los niveles de colesterol de los ratones Cdh1 cKO no variaron respecto a los animales Control (Figura 33A), sugiriendo que APC/C-Cdh1 no participa en la homeostasis del colesterol.

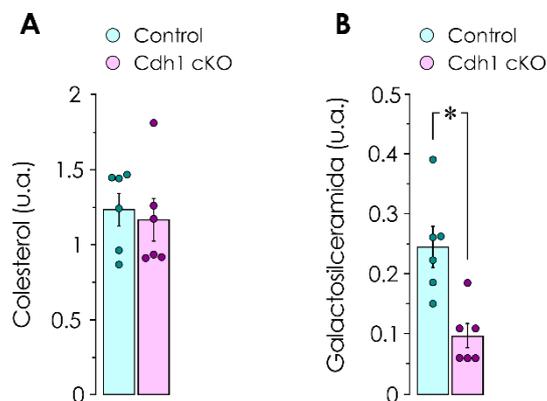


Figura 33. La ausencia de Cdh1 altera los niveles de galactosilceramida, pero no de colesterol. Representación de los niveles del colesterol (A) y galactosilceramida (B) obtenidos en el estudio metabólico de los animales Control y Cdh1 cKO a P21. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 6 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Welch

Sin embargo, los niveles de galactosilceramidas fueron significativamente menores en los ratones carentes de Cdh1 (**Figura 33B**). Estos glucolípidos forman parte de aproximadamente el 20% de la mielina, dónde ejercen un papel relevante en el mantenimiento y la integridad del sistema de bicapas miélicas (Ozgen et al., 2016). Así, el descenso de las galactosilceramidas es compatible con la descompactación y fragmentación de la mielina observada en los animales Cdh1 cKO (**Figura 28 y 29**).

Principalmente, los fosfolípidos constituyentes de la vaina son las fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas y las fosfatidilserinas, y en menor medida los esfingolípidos (Sengottuvel et al., 2023). En la **Figura 34** se muestran los niveles de los metabolitos pertenecientes a los glicerofosfolípidos mayoritarios en la vaina de mielina (Käkelä et al., 2003). Mientras que no se apreciaron diferencias en los niveles de la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina en los animales carentes de Cdh1. La fosfatidiletanolamina presentó una reducción significativa de su abundancia (**Figura 34**).

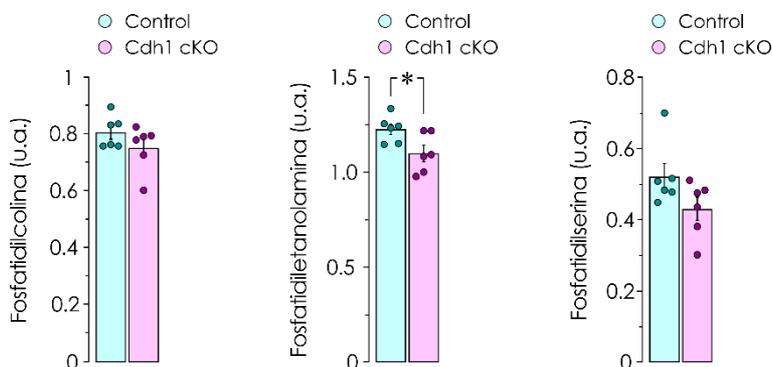


Figura 34. La falta de Cdh1 disminuye los niveles de fosfatidiletanolamina en el cerebro. Gráficas de los niveles de los glicerofosfolípidos mayoritarios del sistema de bicapas miélicas, obtenidos mediante el estudio metabolómico de animales Control y Cdh1 cKO. Datos extraídos del estudio metabolómico. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 6 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Welch.

Finalmente, se analizaron los niveles de los esfingolípidos más relevantes para la estructura y función de la mielina (**Figura 35**). Entre ellos, se encuentran principalmente las esfingomielinas y, en menor medida, las esfingosinas y las esfinganinas (Giussani et al., 2021). Los animales deficientes en Cdh1 presentaron una reducción de los niveles de las esfingomielinas, esfingosinas y, especialmente, de esfinganinas (**Figura 35**).

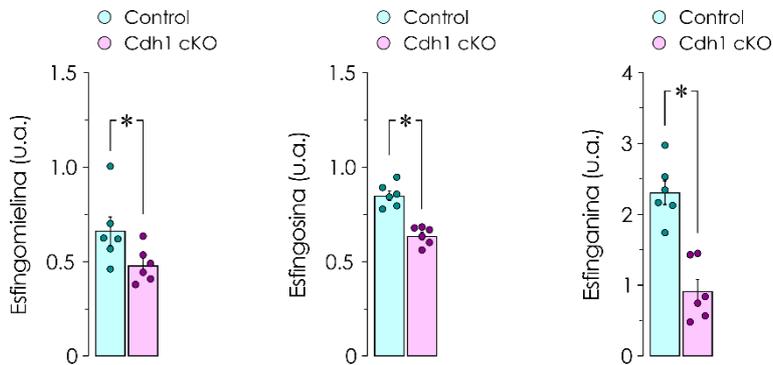


Figura 35. La falta de Cdh1 reduce los niveles de los esfingolípidos del encéfalo. Representación de los niveles de los esfingolípidos más abundantes de la estructura de la vaina de mielina. Datos extraídos del estudio metabolómico. Los valores se expresan como medias \pm S.E.M. de 6 animales por genotipo. * $p < 0,05$ vs Control. Prueba t de Welch.

Nuestros resultados demuestran que la inactivación de APC/C-Cdh1 altera la composición lipídica del encéfalo, especialmente de los metabolitos lipídicos estructurales de la vaina de mielina. Estos cambios provocan alteraciones en la formación y compactación de la vaina de mielina (Mu et al., 2019), lo que relaciona directamente la alteraciones lipídicas con la hipomielinización causada por la falta de Cdh1.

En su conjunto, nuestros resultados demuestran que Cdh1 es esencial para la oligodendrogénesis y mielinización postnatal. La ausencia de Cdh1 provoca disgénesis del cuerpo caloso e hipomielinización en el encéfalo, probablemente como consecuencia de la alteración del metabolismo lipídico, en particular de los lípidos implicados en la

formación y compactación de la mielina. Ello sitúa a Cdh1 en la etiopatogenia de trastornos del neurodesarrollo, especialmente aquellos relacionados con pérdida de sustancia blanca y alteraciones de la vaina de mielina.

DISCUSIÓN

El correcto funcionamiento del cerebro adulto es el resultado de la coordinación entre procesos de formación y estabilización de las conexiones neuronales, así como de la integración de las células gliales en la red neuronal (Allen y Lyons 2018). Durante el desarrollo postnatal la sinaptogénesis, oligodendrogénesis y posterior mielinización permiten la formación, redefinición y estabilización de estas redes neuronales (R. G. Almeida & Lyons, 2017a; Wefelmeyer et al., 2016). La alteración de cualquiera de estos procesos promueve el desarrollo de trastornos del neurodesarrollo, como epilepsia, TEA y leucodistrofias (León de Reyes et al., 2020). En este contexto, la E3 ubiquitina ligasa APC/C-Cdh1 desempeña un papel fundamental en el desarrollo del cerebro, donde regula la neurogénesis, la sinaptogénesis y la dendritogénesis, mediante el recambio de proteínas, a través de la ubiquitinación y la degradación proteasomal (A. Almeida, 2012; Delgado-Esteban et al., 2013). La mutación p.Asp187Gly en la proteína Cdh1 de humanos provoca microcefalia, retraso psicomotor severo y epilepsia refractaria (Rodríguez et al., 2019), alteraciones directamente relacionadas con la disfunción sináptica y la hipomielinización (Repudi et al., 2021). El uso de modelos murinos es una herramienta fundamental para la investigación biosanitaria, especialmente en el estudio de enfermedades humanas. Aun existiendo limitaciones evolutivas, muchas de las vías bioquímicas son compartidas entre las diferentes especies de mamíferos, lo que permite dilucidar los mecanismos fisiopatológicos e implementar futuras dianas terapéuticas (Hafezparast et al., 2002; Tan & Zoghbi, 2019). En este estudio, hemos establecido un modelo murino capaz de mimetizar los efectos causados por la mutación p.Asp187Gly de Cdh1 en humanos, lo que nos ha permitido estudiar los mecanismos implicados en la hipomielinización y disgenesia del cuerpo calloso observados en el paciente que porta esta mutación patogénica. En el paciente, los niveles proteicos de Cdh1 son inferiores a los de un individuo sano, como consecuencia de que la forma mutada se localiza, fundamentalmente en el núcleo, favoreciendo así su degradación proteasomal a través de SCF y la propia actividad de APC/C. Ello provoca la disminución de la

actividad de APC/C por falta de disponibilidad de Cdh1 (Rodríguez et al., 2019a).

En trabajos anteriores, hemos demostrado que Cdh1 coordina la salida de proliferación de los progenitores neurales y la neurogénesis en las etapas tempranas del desarrollo embrionario. Así, mediante la utilización de ratones que portan la Cre bajo el promotor de la Sox2 (Sox2-Cre), demostramos que la falta de Cdh1 induce la apoptosis de los progenitores neurales y microcefalia (Delgado-Esteban et al., 2013). La nestina empieza a expresarse a E9 (Mignone et al., 2004). Sin embargo, la recombinación no es eficiente hasta el final de la gestación (E15-17) (Liang et al., 2012). De hecho, a P0 aún se detecta un 40% de los niveles proteicos de Cdh1, respecto a los Control, lo que, para nuestro estudio, supone una ventaja importante dado que a esa edad los procesos de neurogénesis están prácticamente finalizados (Sauvageot & Stiles, 2002). Los animales Cdh1 cKO utilizados en este trabajo no presentaron microcefalia o la reducción del peso encefálico en el momento del nacimiento, que sí se produce cuando Cdh1 se delecciona en etapas tempranas del desarrollo embrionario y, por tanto, se afecta el inicio de la neurogénesis (Delgado-Esteban et al., 2013). Es más, nos observamos diferencias en el número de neuronas entre genotipos a P21. Por tanto, el modelo Cdh1 Nestin-Cre aquí utilizado permite estudiar la función de Cdh1 en la mielinización postnatal, de forma independiente al proceso neurogénico, siendo una prerrogativa esencial en nuestro estudio.

La mutación p.Asp187Gly de Cdh1 previene el crecimiento postnatal, de manera que el paciente sufre retraso en el incremento del peso y la estatura, que llegan a estar en menos del 3^{er} centil y del 10^o centil, respectivamente, a los 4 años de vida (Rodríguez et al., 2019a). Análisis endocrinológicos realizados en el paciente que mostraba la mutación de Cdh1, muestran un déficit importante de los niveles plasmáticos de Igf1 (36ng/ml), lo que se considera responsable del importante retraso en el crecimiento corporal que sufre. De la misma manera, observamos un claro retraso en el crecimiento de los ratones Cdh1 cKO, que se inicia a

los 7 días de vida y especialmente evidente a los P21, respecto a los Control. Es interesante resaltar que los ratones *Cdh1* cKO tienen unos niveles de Igf1 plasmático (11,79ng/ml) muy inferiores a los Control (38,29 ng/ml), a los P21, lo que de nuevo demuestra la correlación fisiopatológica entre lo observado en el paciente y en nuestro modelo murino. Por tanto, las alteraciones en el crecimiento del individuo pueden ser debidas a alteraciones endocrinológicas, lo que abre una nueva línea de estudio en nuestro laboratorio, que abordaremos en el futuro.

El examen imagenológico por resonancia magnética del paciente reveló una clara disminución de la sustancia blanca, retraso en la mielinización y prácticamente agénesis del cuerpo caloso, alteraciones que también detectamos en los animales carentes de *Cdh1* a P21, tanto por resonancia magnética como por inmunohistoquímica. A P7 el empaquetamiento fisiológico del cuerpo caloso es menor (Cifuentes-Diaz et al., 2023). Sin embargo, a medida que transcurre la mielinización postnatal, el cuerpo caloso se va compactando y reduciendo su espesor (Cifuentes-Diaz et al., 2023), hecho que ocurre a P21. Mientras que a P7 no detectamos cambios en la longitud del cuerpo caloso, probablemente como consecuencia del escaso empaquetamiento fisiológico a esta edad, a P21 hay una clara disgénesis del cuerpo caloso, a juzgar por la disminución en el tamaño de esta estructura, respecto a los animales Control. Ello, junto con el descenso de la densidad celular en el encéfalo, demuestra la disgenesia del cuerpo caloso y disminución de la sustancia blanca en nuestro modelo animal. Estos resultados concuerdan con los obtenidos de las imágenes de resonancia magnética del encéfalo del paciente que porta la mutación de *Cdh1*, lo que demuestra la importancia de *Cdh1* en la mielinización postnatal.

La mielinización se inicia en las zonas más caudales del sistema nervioso central y avanza hacia las áreas más rostrales (van Tilborg et al., 2018). La ausencia de *Cdh1* retrasa el proceso de mielinización, ya que la mielina en la médula espinal, detectada mediante el marcaje con

MBP, en los animales Cdh1 cKO a P7 es significativamente menor que la detectada en animales Control, de la misma edad. Esta alteración es más evidente a P14 y, sobre todo, a P21. Es más, la ausencia de Cdh1 disminuye los niveles de expresión de la proteína MBP en varias zonas del cerebro, tales como cuerpo calloso, corteza, hipocampo y cerebelo, lo que revela la reducción de la mielinización en todas esas áreas.

La proteína MBP producida por los oligodendrocitos, que es esencial para la formación de la mielina en el SNC, tiene como función principal que se adhieran entre sí las diferentes capas que componen la vaina de mielina que recubre los axones del SNC, siendo esencial para la compactación de la vaina (Ozgen et al., 2016). La proteína MOG está ubicada en las capas de mielina del SNC y, aunque su función exacta se desconoce, si se sabe que es clave para el proceso de compactación de la mielina. De hecho, es la última proteína sintetizada por los oligodendrocitos en el proceso de mielinización (Kuhn et al., 2019). Mediante la doble inmunodetección de MBP y MOG, confirmamos que la ausencia de Cdh1 provoca una importante alteración en la formación de la mielina.

El modelo experimental descrito en el presente trabajo mimetiza los efectos de la mutación p.Asp187Gly de Cdh1 en humanos. Es más, se han descrito otras dos mutaciones patogénicas de Cdh1 que provocan hipomielinización en pacientes de temprana edad (Manivannan et al., 2022). Todo ello hace que nuestro modelo sea en una potente herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en los procesos de hipomielinización y desarrollo del cuerpo calloso durante el desarrollo del SNC.

La formación de la mielina está coordinada por factores intrínsecos y extrínsecos que guían y modulan a los OPCs para que diferencien, maduren y sinteticen lípidos y proteínas específicas de la mielina (Mitew et al., 2014; van Tilborg et al., 2018). La alteración de cualquiera de estos procesos promueve la aparición de trastornos del neurodesarrollo, que incluye epilepsia, TEA y leucodistrofias. Así, los efectos de Cdh1 sobre la

mielinización postnatal podrían ser debidos a que APC/C-Cdh1 podría modular la mielinización a través de la coordinación entre la proliferación y/o diferenciación de los OLs o bien mediante la estabilización de la estructura de la mielina, o ambas. Es decir, la hipomielinización causada por la falta de Cdh1 podría ser debido a un retraso en el inicio de la mielinización o a la activación de procesos desmielinizantes. El hecho de que ya a P7 existe una hipomielinización en el Cdh1 cKO y que esta es más acusada a P21 indica que el efecto es debido a un retraso en la mielinización y no a un proceso desmielinizante, al menos en el cerebro en desarrollo.

La principal función de la mielina es facilitar la transmisión sináptica a través del aislamiento axónico y la conducción saltatoria (Kuhn et al., 2019). Durante la formación de la vaina, la propia interacción entre axón y oligodendrocitos es necesaria para estimular el proceso de mielinización, siendo la actividad sináptica un factor clave para la plasticidad de la mielina (Nave, 2010). APC/C-Cdh1 regula la integridad dendrítica y la supervivencia neuronal en el cerebro adulto (Bobo-Jiménez et al., 2017). La falta de Cdh1 promueve la desestructuración del citoesqueleto neuronal a través de la estabilización de Rock2, lo que causa neurodegeneración y deterioro cognitivo (Bobo-Jiménez et al., 2017). Es más, la ausencia de Cdh1 en los precursores neurales, durante etapas tempranas del desarrollo embrionario induce su muerte neuronal mediada por p53 (Delgado-Esteban et al., 2013). La leucodistrofia mielinizante de tipo 6 es una enfermedad neurodegenerativa de inicio temprano, que cursa clínicamente con pérdida neuronal y un patrón de afectación piramidal y cerebeloso (Otero-Domínguez et al., 2018). Sin embargo, es importante destacar que en nuestro modelo el número de neuronas en la corteza fue similar en ambos genotipos, indicando que la pérdida neuronal no es la causa de la hipomielinización. El análisis del número de los axones mielinizables de la corteza y del cuerpo calloso, reveló que la falta de Cdh1 no altera significativamente la red axonal. Así, los animales Cdh1 cKO presentaron un incremento de axones no mielinizados, respecto a los Control. Es más, los axones de mayor calibre

en el ratón *Cdh1* cKO se encontraban sin mielinizar. Todos estos resultados evidencian que la hipomielinización causada por la falta de *Cdh1* no es consecuencia de una posible reducción de los axones.

Durante el desarrollo postnatal, los OPCs proliferan y diferencian para finalmente madurar y sintetizar lípidos y proteínas específicas de la mielina (Mitew et al., 2014b; Saab & Nave, 2017). El crecimiento de la población oligodendroglial es clave para establecer contactos con los axones e inducir su diferenciación (Ozgen et al., 2016). Durante la primera semana de vida se produce una activa proliferación de los OPCs (Zhang et al., 2018). Es importante resaltar que en este momento (P7) los niveles de *Cdh1* son elevados, disminuyendo a P14, lo que podría reflejar su posible función en la regulación de la proliferación y expansión de los OPCs (PDGFR α +). Es más, la falta de *cdh1* aumentó la proliferación de los OPCs a P7, sin embargo, el número de oligodendrocitos maduros (CC1+) del cuerpo calloso no aumentó durante el desarrollo postnatal. APC/C-*Cdh1* es esencial para la salida de las células del ciclo celular (Peters, 2006). La falta de *Cdh1* provoca inestabilidad genómica (García-Higuera et al., 2008), proceso que causa senescencia prematura (Lee & Ong, 2021). A partir de P14, se observan diferencias morfológicas evidentes en los OPCs de ambos genotipos, especialmente en el cuerpo calloso, siendo más acusadas a P21. Así, los OPCs de los animales *Cdh1* cKO tienen un mayor tamaño celular y complejidad de las ramificaciones, respecto a los Control, que son compatibles con una respuesta frente a un daño (Chacon-De-La-Rocha et al., 2020) y/o entrada en senescencia (Vanzulli et al., 2020). De hecho, durante el envejecimiento, los OPCs pierden su capacidad regenerativa y no responden a señales que inducen su diferenciación a OLs, lo que está relacionado con la hipomielinización del cerebro anciano (Neumann et al., 2019; Sim et al., 2002). Por tanto, aunque la falta de *Cdh1* promueve la proliferación de los OPCs, el número de OLs diferenciados y maduros (mielinizantes, CC1+) no varía, probablemente debido a que parte de las OPCs entran en un estado de senescencia. El aumento de la proliferación de los OPCs, junto con la posible entrada en senescencia

de los precursores, pone de manifiesto la relevancia del complejo durante la expansión del linaje oligodendroglial. Sin embargo, no se observaron diferencias en la población de OPCs ni de OLs mielinizantes a P7, edad en la que los animales presentaron un importante retraso en la mielinización, lo que sugiere que el efecto de Cdh1 sobre la mielinización no depende, al menos totalmente, de una alteración del proceso de oligodendrogénesis.

El análisis de la población de oligodendrocitos maduros mielinizantes nos permitió estudiar el efecto del complejo sobre la diferenciación de los OPCs durante el desarrollo postnatal. APC/C-Cdh1 regula la diferenciación de varios linajes celulares, entre ellos neuronas, eritrocitos y cardiomiocitos (Almeida et al., 2005; Cuadrado et al., 2022; Qiao et al., 2010). El factor de transcripción Id2, diana de APC/C-Cdh1 (Lasorella et al., 2006a), inhibe la diferenciación de los OPCs, promoviendo su proliferación (van Tilborg et al., 2018a), lo que concuerda con el incremento en la proliferación de los OPCs en el animal Cdh1 cKO a P7. Sorprendentemente, el porcentaje de OLs maduros y mielinizantes fue similar en ambos genotipos, a juzgar por la inmunodetección de CC1. De hecho, la diferenciación y generación de OLs incrementa durante las primeras semanas de vida tanto en el Control como en el Cdh1 cKO, si bien observamos un pequeño retraso en este último. Es más, los OPCs que proliferaron a P7 fueron capaces de diferenciar a P14, indicando que la falta de Cdh1 no interfiere en la diferenciación de los OPCs a OLs mielinizantes. Es importante destacar que, a diferencia de las células de Schwann que solo pueden mielinizar un único axón (Cristobal & Lee, 2022), los oligodendrocitos tienen la capacidad de mielinizar entre 40 y 60 axones a la vez (Baumann & Pham-Dinh, 2001). Sin embargo, a pesar de ello y de que dispone de OLs mielinizantes, el ratón Cdh1 cKO sufre hipomielinización severa y posee un alto número de axones desmielinizados, lo que descarta que estos efectos sean debidos a un déficit en la alteración de la oligodendrogénesis. Por tanto, APC/C-Cdh1 regula la proliferación de los OPCs, sin afectar significativamente a su capacidad de diferenciación y/o maduración.

Las alteraciones en la sustancia blanca y de la formación de la mielina están implicadas en trastornos del neurodesarrollo, incluido el TEA (Galvez-Contreras et al., 2020). Sin embargo, y a pesar de la hipomielinización, no observamos una disminución en el número de neuronas en los animales *Cdh1* cKO, lo que descarta que la hipomielinización sea consecuencia de un proceso neurodegenerativo. El estudio de la ultraestructura de la vaina de mielina reveló la presencia de vacuolaciones y fragmentaciones en su estructura, en los animales *Cdh1* cKO. Estas malformaciones son características de cambios en la homeostasis lipídica (Payne et al., 2012), que alteran la composición lipídica de las membranas y, en consecuencia, su permeabilidad y fluidez, aportada principalmente por el colesterol (Barnes-Vélez et al., 2023a). Sin embargo, el estudio metabolómico reveló niveles similares de colesterol en ambos genotipos, descartándolo como posible causa de las alteraciones en la estructura de la vaina de mielina. En neuronas, la falta de *Cdh1* promueve la reprogramación metabólica hacia un estado glucolítico, mediante un mecanismo que implica la estabilización de la enzima pro-glucolítica PFKFB3, lo que disminuye la actividad del ciclo de las pentosas fosfato y, con ello, induce estrés redox y muerte neuronal (Burmistrova et al., 2019; Herrero-Mendez et al., 2009; Rodríguez-Rodríguez et al., 2012). Es más, en células tumorales se ha demostrado que la falta de *Cdh1* causa la estabilización de IDH2, una enzima productora de NADPH en las mitocondrias, que contribuye al aumento de especies reactivas de oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*) en la mitosis (Lambhate et al., 2021). Teniendo en cuenta de que el incremento de ROS induce la peroxidación de los lípidos de la mielina, lo que promueve su descompactación y fragmentación (Lassmann & van Horsen, 2016), no podemos descartar que una posible alteración de la homeostasis redox en los animales *Cdh1* cKO y, especialmente, en los OLs sea la responsable de las alteraciones estructurales de la vaina de mielina. En este sentido, los OLs mantienen bajos los niveles de PFKFB3 (Meyer & Rinholm, 2021) con el fin de minimizar el estrés oxidativo y evitar la peroxidación de los lípidos de la mielina (Lambhate et al., 2021). Por

tanto, la falta de Cdh1 podría provocar la acumulación de PFKFB3 y, con ello, inducir estrés oxidativo y peroxidación lipídica, favoreciendo la descompactación y fragmentación de la vaina de mielina. De hecho, la falta de Cdh1 provoca estrés oxidativo en el cerebro, ya que detectamos un incremento de más de 3 veces en el marcador de estrés oxidativo, disulfuro de cisteína-glutatión, en los animales Cdh1 cKO, respecto a los Control. Es más, el análisis preliminar del estudio metabolómico reveló una activación de la glucólisis y disminución del ciclo de las pentosas fosfato en cerebro de los ratones Cdh1 cKO, respecto a los Control (resultados no mostrados). Estos resultados apoyarían que el estrés oxidativo, originado por el desequilibrio metabólico (Herrero-Mendez et al., 2009) podría estar alterando la compactación y estructura de la vaina de mielina. Sin embargo, la presencia de axones completamente desmielinizados en los animales deficientes de Cdh1 indica que los daños estructurales no pueden ser la única causa de la hipomielinización que sufren estos animales. Cabe destacar que, aunque debemos analizarlo con detalle en el futuro, la falta de Cdh1 causa alteraciones metabólicas más allá de la glucólisis. De hecho, la mayor parte de los cambios metabólicos en el ratón Cdh1 cKO están asociados con disminuciones en la síntesis, elongación y metabolismo de ácidos grasos y fosfolípidos. Además, el estudio exhaustivo de los metabolitos nos permitirá determinar en un futuro otras vías metabólicas en la que APC/C-Cdh1 podría estar implicado y dilucidar su relevancia en la homeostasis lipídica cerebral.

La activación de la maquinaria de síntesis y transporte de los lípidos durante la mielinización es clave para la correcta formación de la vaina de mielina y de su empaquetamiento (Ozgen et al., 2016). Estudiar la composición lipídica del encéfalo era crucial para analizar el estado del metabolismo lipídico cerebral en nuestro modelo experimental. Como ya hemos indicado, APC/C-Cdh1 regula el metabolismo glucídico a través de la modulación de los niveles de PFKFB3 (Herrero-Mendez et al., 2009), además de participar en el remodelado mitocondrial (Leite et al., 2023). Estudios recientes asocian la inactivación de APC/C-Cdh1 con la

inhibición del metabolismo de los ácidos grasos en levaduras (Leite et al., 2023). Resultados preliminares de la metabolómica sugieren que la falta de Cdh1 disminuye la síntesis de los ácidos grasos complejos. Los ácidos grasos de cadena corta están aumentados en los animales Cdh1 cKO, mientras que los ácidos grasos de cadena larga, como el palmitato, se encuentran reducidos (resultados no mostrados). El palmitato es la principal fuente de ácidos grasos saturados y monoinsaturados a partir de los cuales se forman los glicolípidos y fosfolípidos (Barnes-Vélez et al., 2023), por lo que su disminución podría estar afectando a la síntesis de los principales componentes de la mielina. Es más, esfingomielinas, esfingosinas y GalC presentaron niveles muy inferiores en cerebro de los animales Cdh1 cKO, en comparación con los animales Control. La esfingosina es estrictamente necesaria para la síntesis de la mielina. Mutaciones en la ceramidasa ácida impiden la síntesis de esfingosina a partir de ceramida, lo que causa ventriculomegalia, hipomielinización y disgénesis del cuerpo calloso (Sikora et al., 2017), patologías que observamos en los animales Cdh1 cKO, por lo que la falta de esfingosina en estos animales podría explicar la hipomielinización. Por otro lado, GalC no es esencial para la formación de la mielina, aunque su principal función recae en proporcionar estabilidad y compactación a la vaina (Barnes-Vélez et al., 2023). Estudios realizados en ratones carentes de la ceramida galactosil transferasa, enzima responsable de la producción de GalC, demostraron su implicación en el mantenimiento de la compactación y estructura de la vaina en el adulto (Barnes-Vélez et al., 2023). Por tanto, APC/C-Cdh1 regula la formación y compactación de la vaina a través de la modulación de la síntesis de los principales componentes de la mielina.

Aunque nuestros resultados indican que la falta de Cdh1 provoca la pérdida de la homeostasis lipídica, a su vez, limita la disponibilidad de lípidos para la correcta formación de la mielina, no podemos descartar la implicación de los factores extrínsecos al proceso de mielinización (Kuhn et al., 2019; Simons & Trotter, 2007). La formación de la mielina y su plasticidad está modulada por la actividad neuronal (Nave, 2010). En

este contexto, la liberación de glutamato activa los receptores AMPA y GABA, presentes en los OPCs y OLs, induciendo la diferenciación de los OPCs y la expresión de genes mielinizantes en los OLs (Bercury & Macklin, 2015). APC/C-Cdh1 coordina la sinaptogénesis durante el desarrollo postnatal, y la plasticidad sináptica en el adulto. La falta de Cdh1 induce la acumulación de Rock2, provocando la pérdida de sinapsis en la corteza y el hipocampo, y consecuentemente, deterioro cognitivo y neurodegeneración (Bobo-Jiménez et al., 2017). Además, la diana de Cdh1, FMRP (J. Huang et al., 2015), está implicada en la regulación de proteínas sinápticas (Kazdoba et al., 2014), y su estabilización altera la plasticidad sináptica (J. Huang et al., 2015). Por tanto, la disfunción sináptica puede ser un proceso complementario a la alteración de la homeostasis lipídica que potencia la hipomielinización causada por la ausencia de Cdh1.

Nuestros resultados demuestran que el complejo APC/C-Cdh1 es esencial para la formación y compactación de la vaina de mielina, ya que regula la homeostasis lipídica cerebral. Por ello, mutaciones patogénicas en Cdh1 están implicadas en la fisiopatología de los trastornos del neurodesarrollo que cursan con alteraciones en la sustancia blanca, como la disgénesis del cuerpo calloso e hipomielinización. Por tanto, identificamos a Cdh1 como una nueva diana molecular a considerar para el establecimiento de futuras terapias en el tratamiento de enfermedades hipomielinizantes.

CONCLUSIONES

A la luz de los resultados obtenidos en el presente trabajo de Tesis Doctoral, podemos concluir que:

1. Cdh1 es esencial para la mielinización y, especialmente, la formación del cuerpo calloso, durante el desarrollo postnatal del sistema nervioso central. Así, la deficiencia de Cdh1 induce hipomielinización y provoca la disgénesis del cuerpo calloso, mimetizando, así, las alteraciones encefálicas en la sustancia blanca causadas por la mutación p.Asp187Gly en humanos.
2. El complejo APC/C-Cdh1 regula la proliferación postnatal de los precursores de oligodendrocitos y, con ello, la expansión del linaje oligodendroglial, sin afectar a su capacidad de diferenciar a oligodendrocitos. La falta de Cdh1 promueve la proliferación de estos precursores e induce cambios morfológicos que podrían ser compatibles con un estado de senescencia, especialmente a los 21 días de vida. Sin embargo, Cdh1 no es esencial para la oligodendrogénesis, ya que los progenitores son capaces de diferenciar a oligodendrocitos en ausencia de Cdh1.
3. Cdh1 regula la homeostasis lipídica cerebral. La falta de Cdh1 altera el metabolismo lipídico, reduciendo los niveles de los principales componentes estructurales de la vaina de mielina, como son los esfingolípidos y las galactosilceramidas, esenciales para la síntesis y mantenimiento de la mielina. Así, APC/C-Cdh1 regula la homeostasis lipídica y, con ello, la mielinización postnatal del sistema nervioso central.

Conclusión final:

Nuestros resultados describen, por primera vez, que APC/C-Cdh1 es esencial para la mielinización y desarrollo del cuerpo calloso, durante el desarrollo postnatal del sistema nervioso central. Así, Cdh1 regula, por un lado, la proliferación de los progenitores de los oligodendrocitos y, por otro, la homeostasis lipídica cerebral, que son procesos fundamentales para la formación y empaquetamiento de la vaina de mielina alrededor de los axones. Estos resultados sitúan a Cdh1 en la etiopatogenia de los trastornos del neurodesarrollo que cursan con hipomielinización o disgénesis del cuerpo calloso, a menudo asociadas con hidrocefalia, epilepsia o trastornos del espectro autista, que son patologías causadas por mutaciones patogénicas de Cdh1 en humanos. Por tanto, nuestro modelo puede proporcionar una herramienta potente para investigar la fisiopatología de estas neuropatologías.

BIBLIOGRAFÍA

Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017a). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters*, 591(24), 3978–3992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>

Agirman, G., Broix, L., & Nguyen, L. (2017b). Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Letters*, 591(24), 3978–3992. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12924>

Allen, N. J., & Lyons, D. A. (2018). Glia as architects of central nervous system formation and function. In *Science* (Vol. 362, Issue 6411, pp. 181–185). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.aat0473>

Almeida, A. (2012a). Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Molecular Neurobiology*, 46(3), 547–554. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8309-2>

Almeida, A. (2012b). Regulation of APC/C-Cdh1 and its function in neuronal survival. *Molecular Neurobiology*, 46(3), 547–554. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8309-2>

Almeida, A., Bolaños, J. P., & Moncada, S. (2010). E3 ubiquitin ligase APC/C-Cdh1 accounts for the Warburg effect by linking glycolysis to cell proliferation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(2), 738–741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913668107>

Almeida, A., Bolaños, J. P., & Moreno, S. (2005a). Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(36), 8115–8121. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1143-05.2005>

Almeida, A., Bolaños, J. P., & Moreno, S. (2005b). Cdh1/Hct1-APC is essential for the survival of postmitotic neurons. *Journal of Neuroscience*, 25(36), 8115–8121. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1143-05.2005>

Almeida, R. G., & Lyons, D. A. (2017a). On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *Journal of Neuroscience*, 37(42), 10023–10034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017>

Almeida, R. G., & Lyons, D. A. (2017b). On myelinated axon plasticity and neuronal circuit formation and function. *Journal of Neuroscience*, 37(42), 10023–10034. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3185-16.2017>

Assetta, B., Tang, C., Bian, J., O'rourke, R., Connolly, K., Brickler, T., Chetty, S., & Huang, Y. W. A. (2020). Generation of human neurons and oligodendrocytes from pluripotent stem cells for modeling neuronoligodendrocyte interactions. *Journal of Visualized Experiments*, 2020(165), 1–15. <https://doi.org/10.3791/61778>

Auguste, Y. S. S., Ferro, A., Kahng, J. A., Xavier, A. M., Dixon, J. R., Vrudhula, U., Nichitiu, A. S., Rosado, D., Wee, T. L., Pedmale, U. V., & Cheadle, L. (2022). Oligodendrocyte precursor cells engulf synapses during circuit remodeling in mice. *Nature Neuroscience*, 25(10), 1273–1278. <https://doi.org/10.1038/s41593-022-01170-x>

Avagliano, L., Massa, V., George, T. M., Qureshy, S., Bulfamante, G. Pietro, & Finnell, R. H. (2019). Overview on neural tube defects: From development to physical characteristics. *Birth Defects Research*, 111(19), 1455–1467. <https://doi.org/10.1002/bdr2.1380>

Bakken, T. E., Miller, J. A., Ding, S. L., Sunkin, S. M., Smith, K. A., Ng, L., Szafer, A., Dalley, R. A., Royall, J. J., Lemon, T., Shapouri, S., Aiona, K., Arnold, J., Bennett, J. L., Bertagnolli, D., Bickley, K., Boe, A., Brouner, K., Butler, S., ... Lein, E. S. (2016). A comprehensive transcriptional map of primate brain development. *Nature*, 535(7612), 367–375. <https://doi.org/10.1038/nature18637>

Bansal, S., & Tiwari, S. (2019). Mechanisms for the temporal regulation of substrate ubiquitination by the anaphase-promoting complex/cyclosome. In *Cell Division* (Vol. 14, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13008-019-0057-5>

Barateiro, A., & Fernandes, A. (2014a). Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1843, Issue 9, pp. 1917–1929). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>

Barateiro, A., & Fernandes, A. (2014b). Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* (Vol. 1843, Issue 9, pp. 1917–1929). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.04.018>

Barnes-Vélez, J. A., Aksoy Yasar, F. B., & Hu, J. (2023a). Myelin lipid metabolism and its role in myelination and myelin maintenance. In *Innovation* (Vol. 4, Issue 1). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100360>

Barnes-Vélez, J. A., Aksoy Yasar, F. B., & Hu, J. (2023b). Myelin lipid metabolism and its role in myelination and myelin maintenance. In *Innovation* (Vol. 4, Issue 1). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2022.100360>

Bassell, G. J., & Warren, S. T. (2008). Fragile X Syndrome: Loss of Local mRNA Regulation Alters Synaptic Development and Function. In *Neuron* (Vol. 60, Issue 2, pp. 201–214). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.10.004>

Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001a). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. <http://physrev.physiology.org>

Baumann, N., & Pham-Dinh, D. (2001b). Biology of Oligodendrocyte and Myelin in the Mammalian Central Nervous System. *Physiological Reviews*, 81(2), 871–927. <http://physrev.physiology.org>

Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2015a). Dynamics and mechanisms of CNS myelination. In *Developmental Cell* (Vol. 32, Issue 4, pp. 447–458). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.016>

Bercury, K. K., & Macklin, W. B. (2015b). Dynamics and mechanisms of CNS myelination. In *Developmental Cell* (Vol. 32, Issue 4, pp. 447–458). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.01.016>

Bergles, D. E., Hopkins, J., Dimas, P., Montani, L., Pereira, J. A., Moreno, D., Trö tzmüller, M., Gerber, J., Semenkovich, C. F., Kö feler, H. C., & Suter, U. (2019). CNS myelination and remyelination depend on fatty acid synthesis by oligodendrocytes. <https://doi.org/10.7554/eLife.44702.001>

Bergles, D. E., & Richardson, W. D. (2016). Oligodendrocyte development and plasticity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(2). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020453>

Bernal, A., & Arranz, L. (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 75, Issue 12, pp. 2177–2195). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2794-z>

Bernardo, A., De Nuccio, C., Visentin, S., Martire, A., Minghetti, L., Popoli, P., & Ferrante, A. (2021). Myelin defects in niemann–pick type c disease: Mechanisms and possible therapeutic perspectives. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16). <https://doi.org/10.3390/ijms22168858>

Bick, M. D., & Davidson, R. L. (1974). Total Substitution of Bromodeoxyuridine for Thymidine in the DNA of a Bromodeoxyuridine-Dependent Cell Line (mammalian cells) (Vol. 71, Issue 5). <https://doi.org/10.1073/pnas.71.5.2082>

Binamé, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., & Trotter, J. (2013a). NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10858–10874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5010-12.2013>

Binamé, F., Sakry, D., Dimou, L., Jolivel, V., & Trotter, J. (2013b). NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *Journal of Neuroscience*, 33(26), 10858–10874. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5010-12.2013>

Birey, F., Kokkosis, A. G., & Aguirre, A. (2017). Oligodendroglia-lineage cells in brain plasticity, homeostasis and psychiatric disorders. *Current Opinion in Neurobiology*, 47, 93–103. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.016>

Blaauw, J., & Meiners, L. C. (2020). The splenium of the corpus callosum: embryology, anatomy, function and imaging with pathophysiological hypothesis. *Neuroradiology*, 62(5), 563–585. <https://doi.org/10.1007/s00234-019-02357-z>

Bobo-Jiménez, V., Delgado-Esteban, M., Angibaud, J., Sánchez-Morán, I., De La Fuente, A., Yajeya, J., Nägerl, U. V., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2017a). APC/CCdh1-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4513–4518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616024114>

Bobo-Jiménez, V., Delgado-Esteban, M., Angibaud, J., Sánchez-Morán, I., De La Fuente, A., Yajeya, J., Nägerl, U. V., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2017b). APC/CCdh1-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4513–4518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616024114>

Bobo-Jiménez, V., Delgado-Esteban, M., Angibaud, J., Sánchez-Morán, I., De La Fuente, A., Yajeya, J., Nägerl, U. V., Castillo, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2017c). APC/CCdh1-Rock2 pathway controls dendritic integrity and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(17), 4513–4518. <https://doi.org/10.1073/pnas.1616024114>

Bolaños, J. P., Almeida, A., & Moncada, S. (2010a). Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 35, Issue 3, pp. 145–149). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>

Bolaños, J. P., Almeida, A., & Moncada, S. (2010b). Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 35, Issue 3, pp. 145–149). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.006>

Bonvento, G., & Bolaños, J. P. (2021a). Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. In *Cell Metabolism* (Vol. 33, Issue 8, pp. 1546–1564). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.006>

Bonvento, G., & Bolaños, J. P. (2021b). Astrocyte-neuron metabolic cooperation shapes brain activity. In *Cell Metabolism* (Vol. 33, Issue 8, pp. 1546–1564). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.07.006>

Breton, J. M., Long, K. L. P., Barraza, M. K., Perloff, O. S., & Kaufer, D. (2021). Hormonal regulation of oligodendrogenesis II: Implications for myelin repair. In *Biomolecules* (Vol. 11, Issue 2, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom11020290>

Bribián, A., & de Castro, F. (2007). Oligodendrocitos: origen embrionario, migración e implicaciones terapéuticas. *Rev Neurol*, 45 (9), 535–546.

Brouwers, B., De Faudeur, G., Osipovich, A. B., Goyvaerts, L., Lemaire, K., Boesmans, L., Cauwelier, E. J. G., Granvik, M., Pruniau, V. P. E. G., Van Lommel, L., Van Schoors, J., Stancill, J. S., Smolders, I., Goffin, V., Binart, N., In'T Veld, P., Declercq, J., Magnuson, M. A., Creemers, J. W. M., ... Schraenen, A. (2014). Impaired islet function in commonly used transgenic mouse lines due to human growth hormone minigene expression. *Cell Metabolism*, 20(6), 979–990. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.11.004>

Buckner, R. L. (2013). The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. In *Neuron* (Vol. 80, Issue 3, pp. 807–815). <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.10.044>

Burmistrova, O., Olias-Arjona, A., Lapresa, R., Jimenez-Blasco, D., Eremeeva, T., Shishov, D., Romanov, S., Zakurdaeva, K., Almeida, A., Fedichev, P. O., & Bolaños, J. P. (2019). Targeting PFKFB3 alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in mice. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48196-z>

Camargo, N., Goudriaan, A., van Deijk, A. L. F., Otte, W. M., Brouwers, J. F., Lodder, H., Gutmann, D. H., Nave, K. A., Dijkhuizen, R. M., Mansvelter, H. D., Chrast, R., Smit, A. B., & Verheijen, M. H. G. (2017). Oligodendroglial myelination requires astrocyte-derived lipids. *PLoS Biology*, 15(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002605>

Cappell, S. D., Mark, K. G., Garbett, D., Pack, L. R., Rape, M., & Meyer, T. (2018). EMI1 switches from being a substrate to an inhibitor of APC/CCDH1 to start the cell cycle. *Nature*, 558(7709), 313–317. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0199-7>

Chacon-De-La-Rocha, I., Fryatt, G., Rivera, A. D., Verkhatsky, A., Raineteau, O., Gomez-Nicola, D., & Butt, A. M. (2020). Accelerated Dystrophy and Decay of Oligodendrocyte Precursor Cells in the APP/PS1 Model of Alzheimer's-Like Pathology. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.575082>

Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., & Barford, D. (2014a). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature*, 513(7518), 388–393. <https://doi.org/10.1038/nature13543>

Chang, L., Zhang, Z., Yang, J., McLaughlin, S. H., & Barford, D. (2014b). Molecular architecture and mechanism of the anaphase-promoting complex. *Nature*, 513(7518), 388–393. <https://doi.org/10.1038/nature13543>

Chavhan, G. B., Babyn, P. S., Thomas, B., Shroff, M. M., & Mark Haacke, E. (2009). Principles, techniques, and applications of T2*-based MR imaging and its special applications. *Radiographics*, 29(5), 1433–1449. <https://doi.org/10.1148/rg.295095034>

Chen, H., & Firestein, B. L. (2007). RhoA regulates dendrite branching in hippocampal neurons by decreasing cypin protein levels. *Journal of Neuroscience*, 27(31), 8378–8386. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0872-07.2007>

Cheng, C., Lau, S. K. M., & Doering, L. C. (2016). Astrocyte-secreted thrombospondin-1 modulates synapse and spine defects in the fragile X mouse model. *Molecular Brain*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13041-016-0256-9>

Chini, M., & Hanganu-Opatz, I. L. (2021). Prefrontal Cortex Development in Health and Disease: Lessons from Rodents and Humans. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 44, Issue 3, pp. 227–240). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.10.017>

Cifuentes-Diaz, C., Canali, G., Garcia, M., Druart, M., Manett, T., Savariradjane, M., Guillaume, C., Le Magueresse, C., & Goutebroze, L. (2023). Differential impacts of Cntnap2 heterozygosity and Cntnap2 null homozygosity on axon and myelinated fiber development in mouse. *Frontiers in Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnins.2023.1100121>

Costa, A. R., Pinto-Costa, R., Sousa, S. C., & Sousa, M. M. (2018). The Regulation of Axon Diameter: From Axonal Circumferential Contractility to Activity-Dependent Axon Swelling. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00319>

Cristobal, C. D., & Lee, H. K. (2022). Development of myelinating glia: An overview. In *GLIA* (Vol. 70, Issue 12, pp. 2237–2259). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.24238>

Cuadrado, M., Garzón, J., Moreno, S., & García-Higuera, I. (2022). Efficient terminal erythroid differentiation requires the APC/C cofactor Cdh1 to limit replicative stress in erythroblasts. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14331-6>

Cuende, J., Moreno, S., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2008). Retinoic acid downregulates Rae1 leading to APCCdh1 activation and neuroblastoma SH-SY5Y differentiation. *Oncogene*, 27(23), 3339–3344. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210987>

Davey, N. E., & Morgan, D. O. (2016). Building a Regulatory Network with Short Linear Sequence Motifs: Lessons from the Degrons of the Anaphase-Promoting Complex. In *Molecular Cell* (Vol. 64, Issue 1, pp. 12–23). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.006>

Davis, D. L., Mahawar, U., Pope, V. S., Allegood, J., Sato-Bigbee, C., & Wattenberg, B. W. (2020a). Dynamics of sphingolipids and the serine palmitoyltransferase complex in rat oligodendrocytes during myelination. *Journal of Lipid Research*, 61(4), 505–522. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000627>

Davis, D. L., Mahawar, U., Pope, V. S., Allegood, J., Sato-Bigbee, C., & Wattenberg, B. W. (2020b). Dynamics of sphingolipids and the serine palmitoyltransferase complex in rat oligodendrocytes during myelination. *Journal of Lipid Research*, 61(4), 505–522. <https://doi.org/10.1194/jlr.RA120000627>

de León Reyes, N. S., Bragg-Gonzalo, L., & Nieto, M. (2020). Development and plasticity of the corpus callosum. In *Development (Cambridge)* (Vol. 147, Issue 18). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.189738>

Delgado-Esteban, M., García-Higuera, I., Maestre, C., Moreno, S., & Almeida, A. (2013a). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3879>

Delgado-Esteban, M., García-Higuera, I., Maestre, C., Moreno, S., & Almeida, A. (2013b). APC/C-Cdh1 coordinates neurogenesis and cortical size during development. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3879>

Depp, C., Sun, T., Sasmita, A. O., Spieth, L., Berghoff, S. A., Nazarenko, T., Overhoff, K., Steixner-Kumar, A. A., Subramanian, S., Arinrad, S., Ruhwedel, T., Möbius, W., Göbbels, S., Saher, G., Werner, H. B., Damkou, A., Zampar, S., Wirths, O., Thalmann, M., ... Nave, K.-A. (2023). Myelin dysfunction drives amyloid- β deposition in models of Alzheimer's disease. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06120-6>

Dewanjee, S., Chakraborty, P., Bhattacharya, H., Chacko, L., Singh, B., Chaudhary, A., Javvaji, K., Pradhan, S. R., Vallamkondu, J., Dey, A., Kalra, R. S., Jha, N. K., Jha, S. K., Reddy, P. H., & Kandimalla, R. (2022). Altered glucose metabolism in Alzheimer's disease: Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 193, pp. 134–157). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.032>

Dragan, A. I., Pavlovic, R., McGivney, J. B., Casas-Finet, J. R., Bishop, E. S., Strouse, R. J., Schenerman, M. A., & Geddes, C. D. (2012). SYBR Green I: Fluorescence properties and interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, 22(4), 1189–1199. <https://doi.org/10.1007/s10895-012-1059-8>

Duncan, I. D., & Radcliff, A. B. (2016). Inherited and acquired disorders of myelin: The underlying myelin pathology. In *Experimental Neurology* (Vol. 283, pp. 452–475). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2016.04.002>

Eguren, M., Manchado, E., & Malumbres, M. (2011). Non-mitotic functions of the Anaphase-Promoting Complex. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 22, Issue 6, pp. 572–578). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.03.010>

Eguren, M., Porlan, E., Manchado, E., García-Higuera, I., Cañamero, M., Fariñas, I., & Malumbres, M. (2013a). The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and

p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3880>

Eguren, M., Porlan, E., Manchado, E., García-Higuera, I., Cañamero, M., Fariñas, I., & Malumbres, M. (2013b). The APC/C cofactor Cdh1 prevents replicative stress and p53-dependent cell death in neural progenitors. *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms3880>

Elbaz, B., & Popko, B. (2019). Molecular Control of Oligodendrocyte Development. In *Trends in Neurosciences* (Vol. 42, Issue 4, pp. 263–277). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2019.01.002>

Eme, L., Trilles, A., Moreira, D., & Brochier-Armanet, C. (2011). The phylogenomic analysis of the anaphase promoting complex and its targets points to complex and modern-like control of the cell cycle in the last common ancestor of eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-265>

Emery, B. (2010). Regulation of Oligodendrocyte Differentiation and Myelination. *Science*, 330, 779–782. <http://science.sciencemag.org/>

Emery, B., Agalliu, D., Cahoy, J. D., Watkins, T. A., Dugas, J. C., Mulinyawe, S. B., Ibrahim, A., Ligon, K. L., Rowitch, D. H., & Barres, B. A. (2009). Myelin Gene Regulatory Factor Is a Critical Transcriptional Regulator Required for CNS Myelination. *Cell*, 138(1), 172–185. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.031>

Emery, B., & Lu, Q. R. (2015). Transcriptional and epigenetic regulation of oligodendrocyte development and myelination in the central nervous system. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020461>

Farhy-Tselnicker, I., van Casteren, A. C. M., Lee, A., Chang, V. T., Aricescu, A. R., & Allen, N. J. (2017). Astrocyte-Secreted Glypican 4 Regulates Release of Neuronal Pentraxin 1 from Axons to Induce Functional Synapse Formation. *Neuron*, 96(2), 428–445. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.053>

Fernandez-Fernandez, S., Almeida, A., & Bolaños, J. P. (2012). Antioxidant and bioenergetic coupling between neurons and astrocytes. In *Biochemical Journal* (Vol. 443, Issue 1, pp. 3–12). <https://doi.org/10.1042/BJ20111943>

From, R., Eilam, R., Bar-Lev, D. D., Levin-Zaidman, S., Tsoory, M., Lopresti, P., Sela, M., Arnon, R., & Aharoni, R. (2014). Oligodendrogenesis and myelinogenesis during postnatal development effect of glatiramer acetate. *GLIA*, 62(4), 649–665. <https://doi.org/10.1002/glia.22632>

Fuchsberger, T., Lloret, A., & Viña, J. (2017). New functions of APC/C ubiquitin ligase in the nervous system and its role in alzheimer's disease. In *International Journal*

of Molecular Sciences (Vol. 18, Issue 5). MDPI AG.
<https://doi.org/10.3390/ijms18051057>

Fuchsberger, T., Martínez-Bellver, S., Giraldo, E., Teruel-Martí, V., Lloret, A., & Viña, J. (2016). A β Induces Excitotoxicity Mediated by APC/C-Cdh1 Depletion That Can Be Prevented by Glutaminase Inhibition Promoting Neuronal Survival. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep31158>

Fujita, Y., & Yamashita, T. (2014). Axon growth inhibition by RhoA/ROCK in the central nervous system. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 8, Issue OCT). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00338>

Fumagalli, M., Bonfanti, E., Daniele, S., Zappelli, E., Lecca, D., Martini, C., Trincavelli, M. L., & Abbracchio, M. P. (2015). The ubiquitin ligase Mdm2 controls oligodendrocyte maturation by intertwining mTOR with G protein-coupled receptor kinase 2 in the regulation of GPR17 receptor desensitization. *GLIA*, 63(12), 2327–2339. <https://doi.org/10.1002/glia.22896>

Fünfschilling, U., Supplie, L. M., Mahad, D., Boretius, S., Saab, A. S., Edgar, J., Brinkmann, B. G., Kassmann, C. M., Tzvetanova, I. D., Möbius, W., Diaz, F., Meijer, D., Suter, U., Hamprecht, B., Sereda, M. W., Moraes, C. T., Frahm, J., Goebbels, S., & Nave, K. A. (2012). Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity. *Nature*, 485(7399), 517–521. <https://doi.org/10.1038/nature11007>

Galvez-Contreras, A. Y., Zarate-Lopez, D., Torres-Chavez, A. L., & Gonzalez-Perez, O. (2020). Role of oligodendrocytes and myelin in the pathophysiology of autism spectrum disorder. In *Brain Sciences* (Vol. 10, Issue 12, pp. 1–17). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/brainsci10120951>

García-Higuera, I., Manchado, E., Dubus, P., Cañamero, M., Méndez, J., Moreno, S., & Malumbres, M. (2008). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nature Cell Biology*, 10(7), 802–811. <https://doi.org/10.1038/ncb1742>

García-Higuera, I., Manchado, E., Dubus, P., Cañamero, M., Méndez, J., Moreno, S., & Malumbres, M. (2008a). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nature Cell Biology*, 10(7), 802–811. <https://doi.org/10.1038/ncb1742>

García-Higuera, I., Manchado, E., Dubus, P., Cañamero, M., Méndez, J., Moreno, S., & Malumbres, M. (2008b). Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nature Cell Biology*, 10(7), 802–811. <https://doi.org/10.1038/ncb1742>

Gautier, J.-C. (2017). *Drug Safety Evaluation Methods and Protocols* (2nd ed.). <http://www.springer.com/series/7651>

Gioia, U., Tavella, S., Martínez-Orellana, P., Cicio, G., Colliva, A., Ceccon, M., Cabrini, M., Henriques, A. C., Fumagalli, V., Paldino, A., Presot, E., Rajasekharan, S.,

Iacomino, N., Pisati, F., Matti, V., Sepe, S., Conte, M. I., Barozzi, S., Lavagnino, Z., ... d'Adda di Fagagna, F. (2023). SARS-CoV-2 infection induces DNA damage, through CHK1 degradation and impaired 53BP1 recruitment, and cellular senescence. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/s41556-023-01096-x>

Giussani, P., Prinetti, A., & Tringali, C. (2021a). The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 156, Issue 4, pp. 403–414). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15133>

Giussani, P., Prinetti, A., & Tringali, C. (2021b). The role of Sphingolipids in myelination and myelin stability and their involvement in childhood and adult demyelinating disorders. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 156, Issue 4, pp. 403–414). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1111/jnc.15133>

Goldstein, A., Covington, B. P., Mhabadi, N., & Mesfin, F. B. (2023). *Neuroanatomy, Corpus Callosum*.

Götz, M., & Huttner, W. B. (2005). The cell biology of neurogenesis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 6, Issue 10, pp. 777–788). <https://doi.org/10.1038/nrm1739>

Guarnieri, F. C., de Chevigny, A., Falace, A., & Cardoso, C. (2018). Disorders of neurogenesis and cortical development. *Dialogues in Clinical Neuroscience*, 20, 255–266. www.dialogues-cns.org

Hafezparast, M., Ahmad-Annuar, A., Wood, N. W., Tabrizi, S. J., & Fisher, E. M. (2002). Mouse models for neurological disease. *The Lancet Neurology*, 1, 215–224.

Hattingen, E., Jurcoane, A., Daneshvar, K., Pilatus, U., Mittelbronn, M., Steinbach, J. P., & Bähr, O. (2013). Quantitative T2 mapping of recurrent glioblastoma under bevacizumab improves monitoring for non-enhancing tumor progression and predicts overall survival. *Neuro-Oncology*, 15(10), 1395–1404. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not105>

Heng, M. Y., Lin, S. T., Verret, L., Huang, Y., Kamiya, S., Padiath, Q. S., Tong, Y., Palop, J. J., Huang, E. J., Ptáček, L. J., & Fu, Y. H. (2013). Lamin B1 mediates cell-autonomous neuropathology in a leukodystrophy mouse model. *Journal of Clinical Investigation*, 123(6), 2719–2729. <https://doi.org/10.1172/JCI66737>

Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2009a). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature Cell Biology*, 11(6), 747–752. <https://doi.org/10.1038/ncb1881>

Herrero-Mendez, A., Almeida, A., Fernández, E., Maestre, C., Moncada, S., & Bolaños, J. P. (2009b). The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature Cell Biology*, 11(6), 747–752. <https://doi.org/10.1038/ncb1881>

Herskowitz, J. H., Feng, Y., Mattheyses, A. L., Hales, C. M., Higginbotham, L. A., Duong, D. M., Montine, T. J., Troncoso, J. C., Thambisetty, M., Seyfried, N. T., Levey, A. I., & Lah, J. J. (2013). Pharmacologic inhibition of ROCK2 suppresses amyloid- β production in an Alzheimer's disease mouse model. *Journal of Neuroscience*, 33(49), 19086–19098. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2508-13.2013>

Honvo-Houéto, E., & Truchet, S. (2015). Indirect immunofluorescence on frozen sections of mouse mammary gland. *Journal of Visualized Experiments*, 2015(106). <https://doi.org/10.3791/53179>

Hornig, J., Fröb, F., Vogl, M. R., Hermans-Borgmeyer, I., Tamm, E. R., & Wegner, M. (2013). The Transcription Factors Sox10 and Myrf Define an Essential Regulatory Network Module in Differentiating Oligodendrocytes. *PLoS Genetics*, 9(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003907>

Huang, J., & Bonni, A. (2016a). A decade of the anaphase-promoting complex in the nervous system. <https://doi.org/10.1101/gad.274324>

Huang, J., & Bonni, A. (2016b). A decade of the anaphase-promoting complex in the nervous system. <https://doi.org/10.1101/gad.274324>

Huang, J., Ikeuchi, Y., Malumbres, M., & Bonni, A. (2015). A Cdh1-APC/FMRP Ubiquitin Signaling Link Drives mGluR-Dependent Synaptic Plasticity in the Mammalian Brain. *Neuron*, 86(3), 726–739. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.03.049>

Huang, W., Bhaduri, A., Velmeshev, D., Wang, S., Wang, L., Rottkamp, C. A., Alvarez-Buylla, A., Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2020a). Origins and Proliferative States of Human Oligodendrocyte Precursor Cells. *Cell*, 182(3), 594-608.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.027>

Huang, W., Bhaduri, A., Velmeshev, D., Wang, S., Wang, L., Rottkamp, C. A., Alvarez-Buylla, A., Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2020b). Origins and Proliferative States of Human Oligodendrocyte Precursor Cells. *Cell*, 182(3), 594-608.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.027>

Iavarone, A., & Lasorella, A. (2004). Id proteins in neural cancer. *Cancer Letters*, 204(2), 189–196. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(03\)00455-5](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(03)00455-5)

Ishikawa, Y., Yamamoto, N., Yoshimoto, M., & Ito, H. (2012). The primary brain vesicles revisited: Are the three primary vesicles (forebrain/midbrain/hindbrain)

universal in vertebrates? *Brain, Behavior and Evolution*, 79(2), 75–83. <https://doi.org/10.1159/000334842>

Jiang, M., Liu, L., He, X., Wang, H., Lin, W., Wang, H., Yoon, S. O., Wood, T. L., & Lu, Q. R. (2016). Regulation of PERK-eIF2a signalling by tuberous sclerosis complex-1 controls homeostasis and survival of myelinating oligodendrocytes. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12185>

Käkelä, R., Somerharju, P., & Tyynelä, J. (2003). Analysis of phospholipid molecular species in brains from patients with infantile and juvenile neuronal-ceroid lipofuscinosis using liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Neurochemistry*, 84(5), 1051–1065. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01602.x>

Kandel, E. (2001). *Principios de neurociencia* (McGraw-Hill Interamericana de España, Ed.; 1aErik).

Kazdoba, T. M., Leach, P. T., Silverman, J. L., & Crawley, J. N. (2014). Modeling fragile X syndrome in the *Fmr1* knockout mouse. *Intractable and Rare Diseases Research*, 3(4), 118–133. <https://doi.org/10.5582/irdr.2014.01024>

Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson, W. D. (2006). Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nature Neuroscience*, 9(2), 173–179. <https://doi.org/10.1038/nn1620>

Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory Animal Research*, 34(4), 147. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>

Knight, M. J., McCann, B., Tsvos, D., Dillon, S., Coulthard, E., & Kauppinen, R. A. (2016). Quantitative T2 mapping of white matter: Applications for ageing and cognitive decline. *Physics in Medicine and Biology*, 61(15), 5587–5605. <https://doi.org/10.1088/0031-9155/61/15/5587>

Köhler, W., Curiel, J., & Vanderver, A. (2018). Adulthood leukodystrophies. *Nature Reviews Neurology*, 14(2), 94–105. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2017.175>

Koleske, A. J. (2013). Molecular mechanisms of dendrite stability. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 14, Issue 8, pp. 536–550). <https://doi.org/10.1038/nrn3486>

Koyama, R., & Ikegaya, Y. (2015). Microglia in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Neuroscience Research*, 100, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2015.06.005>

Kuhn, S., Griffl, L., Crooks, D., & Dombrowski, Y. (2019). Oligodendrocytes in development, myelin generation and beyond. In *Cells* (Vol. 8, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells8111424>

Kurien, B. T., & Scoo Eld Editors, R. H. (2015). *Detection of Blotted Proteins Methods and Protocols*. <http://www.springer.com/series/7651>

Kurshan, P. T., & Shen, K. (2019). Synaptogenic pathways. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 57, pp. 156–162). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.03.005>

Lambhate, S., Bhattacharjee, D., & Jain, N. (2021). APC/C CDH1 ubiquitinates IDH2 contributing to ROS increase in mitosis. *Cellular Signalling*, 86. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110087>

Lapresa, R., Agulla, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2022a). APC/C-Cdh1-targeted substrates as potential therapies for Alzheimer's disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1086540>

Lapresa, R., Agulla, J., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2022b). APC/C-Cdh1-targeted substrates as potential therapies for Alzheimer's disease. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1086540>

Lapresa, R., Agulla, J., Gonzalez-Guerrero, S., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2022a). Amyloid- β Induces Cdh1-Mediated Rock2 Stabilization Causing Neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.884470>

Lapresa, R., Agulla, J., Gonzalez-Guerrero, S., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2022b). Amyloid- β Induces Cdh1-Mediated Rock2 Stabilization Causing Neurodegeneration. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.884470>

Lasorella, A., Stegmüller, J., Guardavaccaro, D., Liu, G., Carro, M. S., Rothschild, G., De La Torre-Ubieta, L., Pagano, M., Bonni, A., & Iavarone, A. (2006a). Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature*, 442(7101), 471–474. <https://doi.org/10.1038/nature04895>

Lasorella, A., Stegmüller, J., Guardavaccaro, D., Liu, G., Carro, M. S., Rothschild, G., De La Torre-Ubieta, L., Pagano, M., Bonni, A., & Iavarone, A. (2006b). Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. *Nature*, 442(7101), 471–474. <https://doi.org/10.1038/nature04895>

Lassmann, H., & van Horssen, J. (2016). Oxidative stress and its impact on neurons and glia in multiple sclerosis lesions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(3), 506–510. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2015.09.018>

Lee, J. W., & Ong, E. B. B. (2021). Genomic Instability and Cellular Senescence: Lessons From the Budding Yeast. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 8). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.619126>

Leite, A. C., Barbedo, M., Costa, V., & Pereira, C. (2023). The APC/C Activator Cdh1p Plays a Role in Mitochondrial Metabolic Remodelling in Yeast. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4). <https://doi.org/10.3390/ijms24044111>

León de Reyes, N. S., Bragg-Gonzalo, L., & Nieto, M. (2020). Development and plasticity of the corpus callosum. In *Development* (Vol. 147, Issue 18). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.189738>

Li, C., Xiao, L., Liu, X., Yang, W., Shen, W., Hu, C., Yang, G., & He, C. (2013). A functional role of nmda receptor in regulating the differentiation of oligodendrocyte precursor cells and remyelination. *GLIA*, 61(5), 732–749. <https://doi.org/10.1002/glia.22469>

Liang, H., Hippenmeyer, S., & Ghashghaei, H. T. (2012). A Nestin-cre transgenic mouse is insufficient for recombination in early embryonic neural progenitors. *Biology Open*, 1(12), 1200–1203. <https://doi.org/10.1242/bio.20122287>

Licausi, F., & Hartman, N. W. (2018). Role of mTOR complexes in neurogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5). <https://doi.org/10.3390/ijms19051544>

Listovsky, T., Oren, Y. S., Yudkovsky, Y., Mahbubani, H. M., Weiss, A. M., Lebediker, M., & Brandeis, M. (2004). Mammalian Cdh1/Fzr mediates its own degradation. *EMBO Journal*, 23(7), 1619–1626. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600149>

Liu, W., Wang, Y., Bozi, L. H. M., Fischer, P., Jedrychowski, M. P., Xiao, H., Wu, T., Darabedian, N., He, X., Mills, E. L., Burger, N., Shin, S., Reddy, A., Sprenger, H.-G., Tran, N., Winther, S., Hinshaw, S. M., Shen, J., Seo, H.-S., ... Chouchani, E. T. (2023). Lactate regulates cell cycle by remodeling the anaphase promoting complex. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05939-3>

Long, K. L. P., Breton, J. M., Barraza, M. K., Perloff, O. S., & Kaufer, D. (2021). Hormonal regulation of oligodendrogenesis i: Effects across the lifespan. *Biomolecules*, 11(2), 1–36. <https://doi.org/10.3390/biom11020283>

Lopez-Fabuel, I., Garcia-Macia, M., Buondelmonte, C., Burmistrova, O., Bonora, N., Alonso-Batan, P., Morant-Ferrando, B., Vicente-Gutierrez, C., Jimenez-Blasco, D., Quintana-Cabrera, R., Fernandez, E., Llop, J., Ramos-Cabrer, P., Sharaireh, A., Guevara-Ferrer, M., Fitzpatrick, L., Thomson, C. D., McKay, T. R., Storch, S., ... Bolaños, J. P. (2022). Aberrant upregulation of the glycolytic enzyme PFKFB3 in CLN7 neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature Communications*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28191-1>

Lubs, H. A. (1969). A Marker X Chromosome. *Am J Hum Genet*, 21(3), 231–244.

Lucena-Aguilar, G., Sánchez-López, A. M., Barberán-Aceituno, C., Carrillo-Ávila, J. A., López-Guerrero, J. A., & Aguilar-Quesada, R. (2016). DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreservation and Biobanking*, 14(4), 264–270. <https://doi.org/10.1089/bio.2015.0064>

Luo, L., Pervaiz, S., & Clement, M. V. (2023). A superoxide-driven redox state promotes geroconversion and resistance to senolysis in replication-stress associated senescence. *Redox Biology*, 64. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102757>

Luoma, A. M., Kuo, F., Cakici, O., Crowther, M. N., Denninger, A. R., Avila, R. L., Brites, P., & Kirschner, D. A. (2015). Plasmalogen phospholipids protect internodal myelin from oxidative damage. *Free Radical Biology and Medicine*, 84, 296–310. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.03.012>

Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Gomez-Sanchez, J. C., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2008). Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *EMBO Journal*, 27(20), 2736–2745. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.195>

Magaki, S., Hojat, S. A., Wei, B., So, A., & Yong, W. H. (2019). An introduction to the performance of immunohistochemistry. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 1897, pp. 289–298). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_25

Maldonado, P. P., Vélez-Fort, M., Levavasseur, F., & Angulo, M. C. (2013). Oligodendrocyte precursor cells are accurate sensors of local K⁺ in mature gray matter. *Journal of Neuroscience*, 33(6), 2432–2442. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1961-12.2013>

Manivannan, S. N., Roovers, J., Smal, N., Myers, C. T., Turkdogan, D., Roelens, F., Kanca, O., Chung, H.-L., Scholz, T., Hermann, K., Bierhals, T., Caglayan, S. H., Stamberger, H., Working, M., Mefford, H., De Jonghe, P., Yamamoto, S., Weckhuysen, S., & Bellen, H. J. (2022). De novo FZR1 loss-of-function variants cause developmental and epileptic encephalopathies including Myoclonic Atonic Epilepsy. *Brain*, 145(5), 1684–1697. <https://doi.org/10.1101/2021.06.12.21256778>

Martynoga, B., Drechsel, D., & Guillemot, F. (2012). Molecular control of neurogenesis: A view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008359>

Mathews, E. S., Mawdsley, D. J., Walker, M., Hines, J. H., Pozzoli, M., & Appel, B. (2014). Mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA synthase I reveals requirements for isoprenoid and cholesterol synthesis in oligodendrocyte migration arrest, axon wrapping, and myelin gene expression. *Journal of Neuroscience*, 34(9), 3402–3412. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4587-13.2014>

Matiašová, A., Ševc, J., Mikeš, J., Jendželovský, R., Daxnerová, Z., & Fedoročko, P. (2014). Flow cytometric determination of 5-bromo-2'-deoxyuridine pharmacokinetics in blood serum after intraperitoneal administration to rats and mice. *Histochemistry and Cell Biology*, 142(6), 703–712. <https://doi.org/10.1007/s00418-014-1253-7>

McShea, A., Lee, H. gon, Petersen, R. B., Casadesus, G., Vincent, I., Linford, N. J., Funk, J. O., Shapiro, R. A., & Smith, M. A. (2007). Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1772(4), 467–472. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2006.09.010>

Mensch, S., Baraban, M., Almeida, R., Czopka, T., Ausborn, J., El Manira, A., & Lyons, D. A. (2015). Synaptic vesicle release regulates myelin sheath number of individual oligodendrocytes in vivo. *Nature Neuroscience*, 18(5), 628–630. <https://doi.org/10.1038/nn.3991>

Meyer, N., & Rinholm, J. E. (2021). Mitochondria in Myelinating Oligodendrocytes: Slow and Out of Breath? *Metabolites*, 11, 359. <https://doi.org/10.3390/metabo>

Mignone, J. L., Kukekov, V., Chiang, A. S., Steindler, D., & Enikolopov, G. (2004). Neural Stem and Progenitor Cells in Nestin-GFP Transgenic Mice. *Journal of Comparative Neurology*, 469(3), 311–324. <https://doi.org/10.1002/cne.10964>

Mitew, S., Hay, C. M., Peckham, H., Xiao, J., Koenning, M., & Emery, B. (2014a). Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. In *Neuroscience* (Vol. 276, pp. 29–47). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.029>

Mitew, S., Hay, C. M., Peckham, H., Xiao, J., Koenning, M., & Emery, B. (2014b). Mechanisms regulating the development of oligodendrocytes and central nervous system myelin. In *Neuroscience* (Vol. 276, pp. 29–47). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.11.029>

Monnerie, H., Romer, M., Jensen, B. K., Millar, J. S., Jordan-Sciutto, K. L., Kim, S. F., & Grinspan, J. B. (2017). Reduced sterol regulatory element-binding protein (SREBP) processing through site-1 protease (S1P) inhibition alters oligodendrocyte differentiation in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 140(1), 53–67. <https://doi.org/10.1111/jnc.13721>

Montani, L. (2021). Lipids in regulating oligodendrocyte structure and function. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 112, pp. 114–122). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.07.016>

Mu, J., Li, M., Wang, T., Li, X., Bai, M., Zhang, G., & Kong, J. (2019). Myelin Damage in Diffuse Axonal Injury. *Frontiers in Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00217>

Mulkey, R. M., & Malenka, R. C. (1992). Mechanisms Underlying Induction of Homosynaptic Long-Term Depression in Area CA1 of the Hippocampus. In *Neuron* (Vol. 9).

Mullis, K. B. (1990). The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction.

Muñoz-Esquivel, J., Göttle, P., Aguirre-Cruz, L., Flores-Rivera, J., Corona, T., Reyes-Terán, G., Küry, P., & Torres, K. J. (2019). Sildenafil Inhibits Myelin Expression and Myelination of Oligodendroglial Precursor Cells. *ASN Neuro*, 11. <https://doi.org/10.1177/1759091419832444>

Naffaa, V., Magny, R., Regazzetti, A., Van Steenwinckel, J., Gressens, P., Laprévotte, O., Auzeil, N., & Schang, A. L. (2022). Shift in phospholipid and fatty acid contents accompanies brain myelination. *Biochimie*, 203, 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2022.08.010>

Nagai, M., Shibata, A., & Ushimaru, T. (2018). Cdh1 degradation is mediated by APC/C–Cdh1 and SCF–Cdc4 in budding yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 506(4), 932–938. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.10.179>

Nakayama, A. Y., Harms, M. B., & Luo, L. (1995). Small GTPases Rac and Rho in the Maintenance of Dendritic Spines and Branches in Hippocampal Pyramidal Neurons.

Naranjo, Á., & Pintado, B. (2017). Guía práctica para la implementación de la Directiva 2010/63 aplicada a los animales genéticamente alterados. *Animales de Laboratorio*, 74, 37–51.

Naruse, M., Ishizaki, Y., Ikenaka, K., Tanaka, A., & Hitoshi, S. (2017). Origin of oligodendrocytes in mammalian forebrains: a revised perspective. In *Journal of Physiological Sciences* (Vol. 67, Issue 1, pp. 63–70). Springer Tokyo. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0479-7>

Nave, K. A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. In *Nature* (Vol. 468, Issue 7321, pp. 244–252). <https://doi.org/10.1038/nature09614>

Nemes-Baran, A. D., White, D. R., & DeSilva, T. M. (2020). Fractalkine-Dependent Microglial Pruning of Viable Oligodendrocyte Progenitor Cells Regulates Myelination. *Cell Reports*, 32(7). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108047>

Neumann, B., Baror, R., Zhao, C., Segel, M., Dietmann, S., Rawji, K. S., Foerster, S., McClain, C. R., Chalut, K., van Wijngaarden, P., & Franklin, R. J. M. (2019). Metformin Restores CNS Remyelination Capacity by Rejuvenating Aged Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 25(4), 473–485.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.015>

Newman, J. D., Kenkel, W. M., Aronoff, E. C., Bock, N. A., Zametkin, M. R., & Silva, A. C. (2009). A combined histological and MRI brain atlas of the common marmoset

monkey, *Callithrix jacchus*. In *Brain Research Reviews* (Vol. 62, Issue 1, pp. 1–18). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.09.001>

Newville, J., Jantzie, L. L., & Cunningham, L. A. (2017). Embracing oligodendrocyte diversity in the context of perinatal injury. In *Neural Regeneration Research* (Vol. 12, Issue 10, pp. 1575–1585). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.217320>

Newville, J., Valenzuela, C. F., Li, L., Jantzie, L. L., & Cunningham, L. A. (2017). Acute oligodendrocyte loss with persistent white matter injury in a third trimester equivalent mouse model of fetal alcohol spectrum disorder. *GLIA*, 65(8), 1317–1332. <https://doi.org/10.1002/glia.23164>

Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R., & Zhu, X. (2009). Polydendrocytes (NG2 cells): Multifunctional cells with lineage plasticity. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 10, Issue 1, pp. 9–22). <https://doi.org/10.1038/nrn2495>

Niu, J., Yu, G., Wang, X., Xia, W., Wang, Y., Hoi, K. K., Mei, F., Xiao, L., Chan, J. R., & Fancy, S. P. J. (2021). Oligodendroglial ring finger protein Rnf43 is an essential injury-specific regulator of oligodendrocyte maturation. *Neuron*, 109(19), 3104–3118.e6. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2021.07.018>

Noori, R., Park, D., Griffiths, J. D., Bells, S., Frankland, P. W., Mabbott, D., & Lefebvre, J. (2020). Activity-dependent myelination: A glial mechanism of oscillatory self-organization in large-scale brain networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(24), 13227–13237. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916646117>

Oliveira, M., Koshibu, K., Rytz, A., Giuffrida, F., Sultan, S., Patin, A., Gaudin, M., Tomezyk, A., Steiner, P., & Schneider, N. (2022). Early Life to Adult Brain Lipidome Dynamic: A Temporospatial Study Investigating Dietary Polar Lipid Supplementation Efficacy. *Frontiers in Nutrition*, 9. <https://doi.org/10.3389/fnut.2022.898655>

Otero-Domínguez, E., Gómez-Lado, C., Fuentes-Pita, P., Dacruz, D., Barros-Angueira, F., & Eirís-Puñal, J. (2018). Leucodistrofia hipomielinizante de tipo 6. Claves clínicas de neuroimagen en la detección de un caso. *Rev Neurol*, 67(9), 339–342. www.neurologia.com

Ozgen, H., Baron, W., Hoekstra, D., & Kahya, N. (2016a). Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 73, Issue 17, pp. 3291–3310). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2228-8>

Ozgen, H., Baron, W., Hoekstra, D., & Kahya, N. (2016b). Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. In *Cellular and Molecular Life*

Sciences (Vol. 73, Issue 17, pp. 3291–3310). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2228-8>

Ozgen, H., Baron, W., Hoekstra, D., & Kahya, N. (2016c). Oligodendroglial membrane dynamics in relation to myelin biogenesis. In Cellular and Molecular Life Sciences (Vol. 73, Issue 17, pp. 3291–3310). Birkhauser Verlag AG. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2228-8>

Pandey, N., & Vinod, P. K. (2022). Model scenarios for cell cycle re-entry in Alzheimer's disease. *IScience*, 25(7). <https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104543>

Paul, L. K. (2011). Developmental malformation of the corpus callosum: A review of typical callosal development and examples of developmental disorders with callosal involvement. *Journal of Neurodevelopmental Disorders*, 3(1), 3–27. <https://doi.org/10.1007/s11689-010-9059-y>

Paul, L. K., Brown, W. S., Adolphs, R., Tyszka, J. M., Richards, L. J., Mukherjee, P., & Sherr, E. H. (2007). Agensis of the corpus callosum: Genetic, developmental and functional aspects of connectivity. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(4), 287–299. <https://doi.org/10.1038/nrn2107>

Paus, T., & Toro, R. (2009). Could sex differences in white matter be explained by g ratio? In *Frontiers in Neuroanatomy* (Vol. 3, Issue SEP). <https://doi.org/10.3389/neuro.05.014.2009>

Payne, S. C., Bartlett, C. A., Harvey, A. R., Dunlop, S. A., & Fitzgerald, M. (2012a). Myelin sheath decompaction, axon swelling, and functional loss during chronic secondary degeneration in rat optic nerve. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(10), 6093–6101. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10080>

Payne, S. C., Bartlett, C. A., Harvey, A. R., Dunlop, S. A., & Fitzgerald, M. (2012b). Myelin sheath decompaction, axon swelling, and functional loss during chronic secondary degeneration in rat optic nerve. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 53(10), 6093–6101. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-10080>

Pepper, R. E., Pitman, K. A., Cullen, C. L., & Young, K. M. (2018). How do cells of the oligodendrocyte lineage affect neuronal circuits to influence motor function, memory and mood? In *Frontiers in Cellular Neuroscience* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00399>

Peters, J. M. (2006a). The anaphase promoting complex/cyclosome: A machine designed to destroy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 9, pp. 644–656). <https://doi.org/10.1038/nrm1988>

Peters, J. M. (2006b). The anaphase promoting complex/cyclosome: A machine designed to destroy. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 7, Issue 9, pp. 644–656). <https://doi.org/10.1038/nrm1988>

Pfisterer, U., & Khodosevich, K. (2017). Neuronal survival in the brain: Neuron type-specific mechanisms. In *Cell Death and Disease* (Vol. 8, Issue 3). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.64>

Pinto, D., Delaby, E., Merico, D., Barbosa, M., Merikangas, A., Klei, L., Thiruvahindrapuram, B., Xu, X., Ziman, R., Wang, Z., Vorstman, J. A. S., Thompson, A., Regan, R., Pilorge, M., Pellecchia, G., Pagnamenta, A. T., Oliveira, B., Marshall, C. R., Magalhaes, T. R., ... Scherer, S. W. (2014). Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *American Journal of Human Genetics*, *94*(5), 677–694. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2014.03.018>

Placzek, M., Tessier-Lavigne, M., Yamada, T., Jessell, T., & Dodd, J. (1990). Mesodermal Control of Neural Cell Identity: Floor Plate Induction by the. *Science*, *250*(4983), 985–988.

Porteros, Á., Gómez, C., Valero, J., Calvo-Baltanás, F., & Alonso, J. R. (2007). Chemical organization of the macaque monkey olfactory bulb: III. Distribution of cholinergic markers. *Journal of Comparative Neurology*, *501*(6), 854–865. <https://doi.org/10.1002/cne.21280>

Qi, Y., Cai, J., Wu, Y., Wu, R., Lee, Jeffrey, Fu, H., Rao, M., Sussel, L., Rubenstein, J., & Qiu, M. (2001). Control of oligodendrocyte differentiation by the Nkx2.2 homeodomain transcription factor. *Development*, *128*, 2723–2733.

Qiao, X., Zhang, L., Gamper, A. M., Fujita, T., & Wan, Y. (2010). APC/C-Cdh1: From cell cycle to cellular differentiation and genomic integrity. In *Cell Cycle* (Vol. 9, Issue 19, pp. 3904–3912). Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/cc.9.19.13585>

Raybaud, C. (2019). Corpus Callosum: Molecular Pathways in Mice and Human Dysgeneses. *Neuroimaging Clinics of North America*, *29*(3), 445–459. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2019.03.006>

Razek, A. A. K. A., Kandell, A. Y., Elsorogy, L. G., Elmongy, A., & Basett, A. A. (2009). Disorders of cortical formation: MR imaging features. In *American Journal of Neuroradiology* (Vol. 30, Issue 1, pp. 4–11). <https://doi.org/10.3174/ajnr.A1223>

Repudi, S., Steinberg, D. J., Elazar, N., Breton, V. L., Aquilino, M. S., Saleem, A., Abu-Swai, S., Vainshtein, A., Eshed-Eisenbach, Y., Vijayaragavan, B., Behar, O., Hanna, J. J., Peles, E., Carlen, P. L., & Aqeilan, R. I. (2021). Neuronal deletion of *Wwox*, associated with WOREE syndrome, causes epilepsy and myelin defects. *Brain*, *144*(10), 3061–3077. <https://doi.org/10.1093/brain/awab174>

Rigby, M. J., Gomez, T. M., & Puglielli, L. (2020). Glial Cell-Axonal Growth Cone Interactions in Neurodevelopment and Regeneration. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 14). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00203>

Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., & Nilsen, T. W. (2010). Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 5(6). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>

Rodríguez, C., Sánchez-Morán, I., Álvarez, S., Tirado, P., Fernández-Mayoralas, D. M., Calleja-Pérez, B., Almeida, Á., & Fernández-Jaén, A. (2019a). A novel human Cdh1 mutations impairs anaphase promoting complex/cyclosome activity resulting in microcephaly, psychomotor retardation, and epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, 151(1). <https://doi.org/10.1111/jnc.14524>

Rodríguez, C., Sánchez-Morán, I., Álvarez, S., Tirado, P., Fernández-Mayoralas, D. M., Calleja-Pérez, B., Almeida, Á., & Fernández-Jaén, A. (2019b). A novel human Cdh1 mutations impairs anaphase promoting complex/cyclosome activity resulting in microcephaly, psychomotor retardation, and epilepsy. *Journal of Neurochemistry*, 151(1). <https://doi.org/10.1111/jnc.14524>

Rodríguez-Rodríguez, P., Fernández, E., Almeida, A., & Bolões, J. P. (2012). Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell Death and Differentiation*, 19(10), 1582–1589. <https://doi.org/10.1038/cdd.2012.33>

Rolyan, H., Tyurina, Y. Y., Hernandez, M., Amoscato, A. A., Sparvero, L. J., Nmezi, B. C., Lu, Y., Estécio, M. R. H., Lin, K., Chen, J., He, R. R., Gong, P., Rigatti, L. H., Dupree, J., Bayr, H., Kagan, V. E., Casaccia, P., & Padiath, Q. S. (2015). Defects of lipid synthesis are linked to the age-dependent demyelination caused by Lamin B1 overexpression. *Journal of Neuroscience*, 35(34), 2002–2017. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1668-15.2015>

Saab, A. S., & Nave, K. A. (2017). Myelin dynamics: protecting and shaping neuronal functions. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 47, pp. 104–112). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2017.09.013>

Saher, G., & Stumpf, S. K. (2015). Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* (Vol. 1851, Issue 8, pp. 1083–1094). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2015.02.010>

Salzer, J. L., & Zalc, B. (2016). Myelination. *Current Biology*, 26, 971–975.

Sauvageot, C. M., & Stiles, C. D. (2002). Molecular mechanisms controlling cortical gliogenesis. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 12, Issue 3, pp. 244–249). Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0959-4388\(02\)00322-7](https://doi.org/10.1016/S0959-4388(02)00322-7)

Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Schrock, M. S., Stromberg, B. R., Scarberry, L., & Summers, M. K. (2020). APC/C ubiquitin ligase: Functions and mechanisms in tumorigenesis. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 67, pp. 80–91). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2020.03.001>

Sengottuvel, V., Hota, M., Oh, J., Galam, D. L., Wong, B. H., Wenk, M. R., Ghosh, S., Torta, F., & Silver, D. L. (2023a). Deficiency in the omega-3 lysolipid transporter Mfsd2a leads to aberrant oligodendrocyte lineage development and hypomyelination. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI1164118>

Sengottuvel, V., Hota, M., Oh, J., Galam, D. L., Wong, B. H., Wenk, M. R., Ghosh, S., Torta, F., & Silver, D. L. (2023b). Deficiency in the omega-3 lysolipid transporter Mfsd2a leads to aberrant oligodendrocyte lineage development and hypomyelination. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI1164118>

Sikora, J., Dworski, S., Jones, E. E., Kamani, M. A., Micsenyi, M. C., Sawada, T., Le Faouder, P., Bertrand-Michel, J., Dupuy, A., Dunn, C. K., Xuan, I. C. Y., Casas, J., Fabrias, G., Hampson, D. R., Levade, T., Drake, R. R., Medin, J. A., & Walkley, S. U. (2017). Acid Ceramidase Deficiency in Mice Results in a Broad Range of Central Nervous System Abnormalities. *American Journal of Pathology*, 187(4), 864–883. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.12.005>

Sim, F. J., Zhao, C., Penderis, J., & Franklin, R. J. M. (2002). The Age-Related Decrease in CNS Remyelination Efficiency Is Attributable to an Impairment of Both Oligodendrocyte Progenitor Recruitment and Differentiation.

Simons, M., & Trotter, J. (2007). Wrapping it up: the cell biology of myelination. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 17, Issue 5, pp. 533–540). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2007.08.003>

Sivakumar, S., & Gorbisky, G. J. (2015). Spatiotemporal regulation of the anaphase-promoting complex in mitosis. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 16, Issue 2, pp. 82–94). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrm3934>

Stadtländer, -H. (n.d.). Scanning Electron Microscopy and Transmission Electron Microscopy of Mollicutes: Challenges and Opportunities.

Stassart, R. M., Möbius, W., Nave, K. A., & Edgar, J. M. (2018a). The Axon-Myelin unit in development and degenerative disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00467>

Stassart, R. M., Möbius, W., Nave, K. A., & Edgar, J. M. (2018b). The Axon-Myelin unit in development and degenerative disease. In *Frontiers in Neuroscience* (Vol. 12, Issue JUL). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00467>

Stiles, J., & Jernigan, T. L. (2010). The basics of brain development. *Neuropsychology Review*, 20(4), 327–348. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9148-4>

Tan, Q., & Zoghbi, H. Y. (2019). Mouse models as a tool for discovering new neurological diseases. *Neurobiology of Learning and Memory*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2018.07.006>

Tanaka-Arakawa, M. M., Matsui, M., Tanaka, C., Uematsu, A., Uda, S., Miura, K., Sakai, T., & Noguchi, K. (2015a). Developmental changes in the corpus callosum from infancy to early adulthood: A structural magnetic resonance imaging study. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118760>

Tanaka-Arakawa, M. M., Matsui, M., Tanaka, C., Uematsu, A., Uda, S., Miura, K., Sakai, T., & Noguchi, K. (2015b). Developmental changes in the corpus callosum from infancy to early adulthood: A structural magnetic resonance imaging study. *PLoS ONE*, 10(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118760>

Teo, J. D., Marian, O. C., Spiteri, A. G., Nicholson, M., Song, H., Khor, J. X. Y., McEwen, H. P., Ge, A., Sen, M. K., Piccio, L., Fletcher, J. L., King, N. J. C., Murray, S. S., Brüning, J. C., & Don, A. S. (2023). Early microglial response, myelin deterioration and lethality in mice deficient for very long chain ceramide synthesis in oligodendrocytes. *GLIA*, 71(4), 1120–1141. <https://doi.org/10.1002/glia.24329>

Thapar, A., Cooper, M., & Rutter, M. (2017). Neurodevelopmental disorders. *The Lancet Psychiatry*, 4(4), 339–346. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)30376-5](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)30376-5)

Thomason, E. J., Escalante, M., Osterhout, D. J., & Fuss, B. (2020). The oligodendrocyte growth cone and its actin cytoskeleton: A fundamental element for progenitor cell migration and CNS myelination. In *GLIA* (Vol. 68, Issue 7, pp. 1329–1346). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23735>

Tripathi, R. B., Jackiewicz, M., McKenzie, I. A., Kougioumtzidou, E., Grist, M., & Richardson, W. D. (2017). Remarkable Stability of Myelinating Oligodendrocytes in Mice. *Cell Reports*, 21(2), 316–323. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.050>

Trojanowski, J. Q., Walkenstein, N., & Lee, M.-Y. (1986). Expression of Neurofilament Subunits in Neurons of the Central and Peripheral Nervous System: An Immunohistochemical Study with Monoclonal Antibodies. *The Journal of Neuroscience*, 6(3), 650–660.

Tsai, H. H., Niu, J., Munji, R., Davalos, D., Chang, J., Zhang, H., Tien, A. C., Kuo, C. J., Chan, J. R., Daneman, R., & Fancy, S. P. J. (2016). Oligodendrocyte precursors migrate

along vasculature in the developing nervous system. *Science*, 351(6271), 379–384. <https://doi.org/10.1126/science.aad3839>

Valcárcel-Hernández, V., López-Espíndola, D., Guillén-Yunta, M., García-Aldea, Á., López de Toledo Soler, I., Báñez-López, S., & Guadaño-Ferraz, A. (2022). Deficient thyroid hormone transport to the brain leads to impairments in axonal caliber and oligodendroglial development. *Neurobiology of Disease*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2021.105567>

Van Roessel, P., Elliott, D. A., Robinson, I. M., Prokop, A., & Brand, A. H. (2004). Independent regulation of synaptic size and activity by the anaphase-promoting complex. *Cell*, 119(5), 707–718. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.11.028>

van Tilborg, E., de Theije, C. G. M., van Hal, M., Wagenaar, N., de Vries, L. S., Benders, M. J., Rowitch, D. H., & Nijboer, C. H. (2018a). Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. In *GLIA* (Vol. 66, Issue 2, pp. 221–238). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23256>

van Tilborg, E., de Theije, C. G. M., van Hal, M., Wagenaar, N., de Vries, L. S., Benders, M. J., Rowitch, D. H., & Nijboer, C. H. (2018b). Origin and dynamics of oligodendrocytes in the developing brain: Implications for perinatal white matter injury. In *GLIA* (Vol. 66, Issue 2, pp. 221–238). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/glia.23256>

Vanzulli, I., Papanikolaou, M., De-La-Rocha, I. C., Pieropan, F., Rivera, A. D., Gomez-Nicola, D., Verkhratsky, A., Rodríguez, J. J., & Butt, A. M. (2020). Disruption of oligodendrocyte progenitor cells is an early sign of pathology in the triple transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 94, 130–139. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.05.016>

Veas-Pérez de Tudela, M., Delgado-Esteban, M., Maestre, C., Bobo-Jiménez, V., Jiménez-Blasco, D., Vecino, R., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2015). Regulation of Bcl-xL-ATP synthase interaction by mitochondrial cyclin B1–cyclin-dependent kinase-1 determines neuronal survival. *Journal of Neuroscience*, 35(25), 9287–9301. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4712-14.2015>

Veas-Pérez De Tudela, M., Maestre, C., Delgado-Esteban, M., Bolaños, J. P., & Almeida, A. (2015). Cdk5-mediated inhibition of APC/C-Cdh1 switches on the cyclin D1-Cdk4-pRb pathway causing aberrant S-phase entry of postmitotic neurons. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep18180>

Wang, H. (2015). Fragile x mental retardation protein: From autism to neurodegenerative disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 9(FEB), 7. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00043>

Watakabe, A., Ichinohe, N., Ohsawa, S., Hashikawa, T., Komatsu, Y., Rockland, K. S., & Yamamori, T. (2007). Comparative analysis of layer-specific genes in mammalian neocortex. *Cerebral Cortex*, 17(8), 1918–1933. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhl102>

Watson, E. R., Brown, N. G., Peters, J. M., Stark, H., & Schulman, B. A. (2019). Posing the APC/C E3 Ubiquitin Ligase to Orchestrate Cell Division. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 117–134). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.09.007>

Wefelmeyer, W., Puhl, C. J., & Burrone, J. (2016). Homeostatic Plasticity of Subcellular Neuronal Structures: From Inputs to Outputs. *Trends in Neurosciences*, 39(10), 656–667. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.08.004>

Wieder, C., Frainay, C., Poupin, N., Rodríguez-Mier, P., Vinson, F., Cooke, J., Lai, R. P. J., Bundy, J. G., Jourdan, F., & Ebbels, T. (2021). Pathway analysis in metabolomics: Recommendations for the use of over-representation analysis. *PLoS Computational Biology*, 17(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009105>

Winey, M., Meehl, J. B., O'Toole, E. T., & Giddings, T. H. (2014). Conventional transmission electron microscopy. In *Molecular Biology of the Cell* (Vol. 25, Issue 3, pp. 319–323). <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0863>

Wolf, N. I., French-Constant, C., & van der Knaap, M. S. (2021). Hypomyelinating leukodystrophies — unravelling myelin biology. In *Nature Reviews Neurology* (Vol. 17, Issue 2, pp. 88–103). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-00432-1>

Xin, W., & Chan, J. R. (2020). Myelin plasticity: sculpting circuits in learning and memory. *Nature Reviews Neuroscience*, 21(12), 682–694. <https://doi.org/10.1038/s41583-020-00379-8>

Yamano, H. (2019). APC/C: current understanding and future perspectives. In *F1000Research* (Vol. 8). F1000 Research Ltd. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18582.1>

Yattah, C., Hernandez, M., Huang, D., Park, H. J., Liao, W., & Casaccia, P. (2020). Dynamic Lamin B1-Gene Association During Oligodendrocyte Progenitor Differentiation. *Neurochemical Research*, 45(3), 606–619. <https://doi.org/10.1007/s11064-019-02941-y>

Yuen, T. J., Silbereis, J. C., Griveau, A., Chang, S. M., Daneman, R., Fancy, S. P. J., Zahed, H., Maltepe, E., & Rowitch, D. H. (2014). Oligodendrocyte-encoded HIF function couples postnatal myelination and white matter angiogenesis. *Cell*, 158(2), 383–396. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.052>

Zhang, S., Zhu, X., Gui, X., Croteau, C., Song, L., Xu, J., Wang, A., Bannerman, P., & Guo, F. (2018a). Sox2 is essential for oligodendroglial proliferation and differentiation

during postnatal brain myelination and CNS remyelination. *Journal of Neuroscience*, 38(7), 1802–1820. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1291-17.2018>

Zhang, S., Zhu, X., Gui, X., Croteau, C., Song, L., Xu, J., Wang, A., Bannerman, P., & Guo, F. (2018b). Sox2 is essential for oligodendroglial proliferation and differentiation during postnatal brain myelination and CNS remyelination. *Journal of Neuroscience*, 38(7), 1802–1820. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1291-17.2018>

Zhou, Z., He, M., Shah, A. A., & Wan, Y. (2016). Insights into APC/C: From cellular function to diseases and therapeutics. *Cell Division*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13008-016-0021-6>