



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y LEÓN
LABORATORIO DE PLASTICIDAD NEURONAL Y NEURORREPARACIÓN

**ESTUDIO DE LA MICROGLÍA
EN UN MODELO DE NEURODEGENERACIÓN SELECTIVA,
EL RATÓN MUTANTE *PURKINJE CELL DEGENERATION***

TESIS DOCTORAL

David Pérez Boyero

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Eduardo Weruaga Prieto

Dr. David Díaz López

SALAMANCA, MARZO 2024



VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



INSTITUTO DE
NEUROCIENCIAS
CASTILLA Y LEÓN

UNIVERSITY OF SALAMANCA
INSTITUTE OF NEUROSCIENCE OF CASTILLA Y LEÓN
LABORATORY OF NEURONAL PLASTICITY AND NEUROREPAIR

**STUDY OF MICROGLIA IN A MODEL OF SELECTIVE
NEURODEGENERATION, THE *PURKINJE CELL*
DEGENERATION MUTANT MOUSE**

DOCTORAL THESIS

David Pérez Boyero

SUPERVISORS

Dr. Eduardo Weruaga Prieto

Dr. David Díaz López

SALAMANCA, MARCH 2024

Eduardo Weruaga Prieto, Catedrático de Biología Celular de la Universidad de Salamanca, y David Díaz López, Profesor Titular de Biología Celular de la Universidad de Salamanca

HACEMOS CONSTAR:

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la microglía en un modelo de neurodegeneración selectiva, el ratón mutante *Purkinje Cell Degeneration*”, ha sido realizada por D. David Pérez Boyero en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León, Universidad de Salamanca, bajo nuestra dirección y, en nuestra opinión, reúne todos los requisitos científicos y formales para ser defendida y optar al Título de Doctor en Neurociencias por la Universidad de Salamanca (*Doctorado Internacional*).

Salamanca, a 12 de febrero de 2024

Fdo.: Eduardo Weruaga Prieto

Fdo.: David Díaz López



ÍNDICE

Índice

ABREVIATURAS	1
INTRODUCCIÓN	7
La microglía	10
Historia de la microglía	11
Origen de la microglía.....	12
La microglía y sus diferentes estados morfológicos	14
Clasificación morfológica de la microglía	15
<i>Microglía ramificada</i>	16
<i>Microglía ameboide</i>	17
<i>Microglía hiperramificada</i>	17
<i>Microglía de bastón</i>	18
<i>Microglía distrófica</i>	18
Factores que determinan la diversidad morfofisiológica de la microglía	18
La microglía y sus funciones	20
Respuesta inmunológica	21
<i>Citocinas</i>	21
<i>Quimiocinas y ejes de comunicación microglía-neurona</i>	22
Eje CX3CL1-CX3CR1	23
Eje CCL2-CCR2	24
Eje CD200-CD200R	24
<i>Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno</i>	25
Fagocitosis.....	25
Motilidad.....	26
Neurogénesis	26
Vasculogénesis	27
Astrogénesis.....	27
Sinaptogénesis: poda sináptica y formación de espinas dendríticas.....	27
Mielinización	27
La microglía como diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas: los inhibidores de la microglía.....	28
Eliminación de la microglía mediante silenciamiento génico	29
<i>Eliminación de la microglía mediante el uso de fármacos inhibidores</i>	29
El ratón PCD como modelo de neurodegeneración y neuroinflamación selectiva. 31	31
La mutación <i>pcd</i>	32
Patrones de expresión del gen <i>Ccp1</i>	33
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el organismo	34
El cerebelo	35
Características anatómicas y citoarquitectura	35
Conexiones de los circuitos cerebelosos	39
La microglía del cerebelo	41
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el cerebelo	42
Procesos neurodegenerativos.....	42
Procesos de neuroinflamación.....	44

El bulbo olfativo	45
Características anatómicas y citoarquitectura	45
Conexiones de los circuitos olfativos	48
La microglía del bulbo olfativo	50
Efectos de la mutación <i>pcd</i> en el bulbo olfativo	51
Procesos neurodegenerativos.....	51
Procesos de neuroinflamación.....	52
JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
Animales de experimentación	61
Colonia PCD	61
Genotipado de los animales.....	62
Extracción del DNA.....	62
Amplificación del DNA mediante PCR.....	63
Electroforesis en gel de agarosa y visualización de las muestras	64
Diseño y tamaño muestral de los experimentos.....	65
Experimentos <i>in vitro</i>	67
Diferenciación / aislamiento de las células de microglía de las distintas regiones	68
Diferenciación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea hacia	
microglía derivada de la médula ósea.....	68
Aislamiento de la microglía desde la corteza cerebral.....	71
Aislamiento de células microgliales desde cerebelo y bulbo olfativo.....	72
Batería de experimentos <i>in vitro</i> realizados en las células de microglía	73
Análisis con citometría de flujo	74
Análisis de la expresión génica.....	75
<i>Extracción del RNA de las células</i>	75
<i>Retrotranscripción</i>	77
<i>PCR cuantitativa</i>	77
<i>Análisis de datos</i>	81
Análisis inmunocitoquímico	81
Análisis de la fagocitosis.....	82
Análisis de la motilidad celular.....	83
Análisis de la proliferación celular.....	83
Visualización al microscopio y análisis de las imágenes <i>in vitro</i>	84
Análisis estadísticos de los experimentos <i>in vitro</i>	86
Experimentos <i>in vivo</i>	86
Caracterización de la microglía del cerebelo y del bulbo olfativo	86
Análisis génico	87
<i>Extracción del RNA, retrotranscripción y qPCR</i>	87
Análisis histológico	89
<i>Obtención y preparación del tejido</i>	89
<i>Sacrificio y disección</i>	89
<i>Seccionamiento</i>	90
<i>Inmunofluorecencia indirecta</i>	90
Estudio <i>in vivo</i> de la interacción microglía-neurona.....	91
Análisis génicos	91

Tratamiento farmacológico: administración del inhibidor de la microglía PLX5622	92
Prueba de comportamiento motor: prueba de la varilla giratoria o test Rotarod	94
Análisis inmunohistoquímico	94
Visualización al microscopio y análisis de las imágenes <i>in vivo</i>	95
Análisis estadísticos de los experimentos <i>in vivo</i>	96
DISCUSIÓN	101
Experimentación <i>in vitro</i>	104
Validez de los tipos de cultivos de microglía utilizados en cultivo	105
La expresión génica y proteica de las células de microglía de tipo PCD se encuentra alterada	106
El ambiente neurodegenerativo del PCD desencadena una hipertrofia microglial	109
La microglía de tipo PCD presenta una capacidad fagocítica alterada y dependiente de su origen	110
Las células de microglía de tipo PCD presentan una motilidad elevada	113
Las células de microglía derivadas de la médula ósea de ratones PCD presentan una mayor capacidad de proliferación	114
Experimentación <i>in vivo</i>	116
La microglía del cerebelo y del bulbo olfativo de los ratones PCD presenta un expresión génica y proteica característica de los estados de activación de la microglía	117
La comunicación entre la microglía y las neuronas en el ratón PCD se encuentra comprometida antes, durante y después de los procesos neurodegenerativos .	122
La administración de PLX5622 produce una mayor supervivencia de las células de Purkinje y una mejora en las habilidades motoras de los ratones PCD	124
CONCLUSIONES	129
ENGLISH SUMMARY	133
BIBLIOGRAFÍA.....	163
ANEXO I: Soluciones de laboratorio de uso común	187
ANEXO II: Soluciones para cultivos celulares.....	191

ABREVIATURAS

A

AGTPBP1: Proteína de unión AGT/GTP 1 (del inglés *AGT/GTP Biding Protein 1*)

ANOVA: Análisis de la varianza (del inglés *Analysis of Variance*)

B

BHE: Barrera hematoencefálica

BMDML: Microglía derivada de la médula ósea (del inglés *Bone Marrow Derived Microglia - Like*)

BO: Bulbo olfativo

C

CCL2: Ligando 2 de quimiocina (del inglés *chemokine (c-c motif) ligand 2*)

CCR2: Receptor de quimiocinas C-C tipo 2 (del inglés *chemoattractant receptor 2*)

CCM: Capa de las células mitrales

CCP: Capa de las células de Purkinje

CCP1: Carboxipeptidasa citosólica 1 (del inglés *Cytosolic Carboxypeptidase 1*)

CD200: Glicoproteína de membrana OX-2 (del inglés *cluster of differentiation 200*)

CD200R: Receptor 1 de la glicoproteína transmembrana CD200 (del inglés *cluster of differentiation receptor 200*)

CG: Capa de los glomérulos

CGr: Capa de los granos o granular

CM: Capa molecular

CONDCA: Enfermedad neurodegenerativa de origen infantil con atrofia cerebelosa (del inglés *Childhood-Onset NeuroDegeneration with Cerebellar Atrophy*)

CPE: Capa plexiforme externa

CPI: Capa plexiforme interna

CX3CL1: Quimioquina ligando 1 es una pequeña citoquina (del inglés *fractalkine/cx3c chemokine ligand 1*)

CX3CR1: Receptor 1 de quimiocinas con motivo CX3C (del inglés *fractalkine/cx3c receptor 1*)

D

DAMP: Patrones moleculares asociados a daños (del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*)

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

DS: Desviación estándar (del inglés *Desviation Standar*)

E

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés *EthyleneDiamineTetraacetic Acid*)

F

FBS: Suero fetal bovino (del inglés *Fetal Bovine Serum*)

G

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (del inglés *GlycerAldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*)

I

IL: Interleucina

iNOS: Sintasa de óxido nítrico inducible (del inglés *inducible Nitric Oxide Synthase*)

N

NCP: Núcleos cerebelosos profundos

NNA1: proteína 1 nuclear del sistema nervioso inducida por axotomía (del inglés *Neuronal Nuclear Protein Induced by Axotomy 1*)

P

P: Postnatal

pb: Pares de bases

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

PCD: del inglés *Purkinje Cell Degeneration*

PB: Tampón fosfato (del inglés *Phosphate Buffer*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*)

PCD: Degeneración de las células de Purkinje (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

Q

qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (del inglés *quantitative polymerase chain reaction*)

R

rpm: Revoluciones por minuto

RNS: Especies reactivas de nitrógeno (del inglés *Reactive Nitrogen Species*)

RONs: Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (del inglés *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*)

ROS: Especies reactivas de oxígeno (del inglés *Reactive Oxygen Species*)

S

SBPE: Sustancia blanca periependimaria

SDS: Dodecilsulfato sódico (del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SNC: Sistema nervioso central

T

TLR: Receptores tipo Toll (del inglés *Toll Like Receptors*)

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α (del inglés *Tumor Necrosis Factor α*)

W

WT: Silvestre (del inglés *Wild Type*)

INTRODUCCIÓN

Los trastornos neurodegenerativos son un problema creciente en una sociedad cada vez más envejecida. Estas patologías cursan con una muerte neuronal más o menos generalizada que afecta al movimiento, la cognición y/o la afectividad, entre otras funciones (Wes et al., 2016). Etiológicamente, junto con la pérdida neuronal se desencadena una activación del sistema inmunitario que genera una inflamación que, si es excesiva, puede agravar la pérdida neuronal primaria. Así, el estudio de la respuesta inmunitaria en el sistema nervioso central (SNC) y, en particular, la implicación de la microglía en los fenómenos de neurodegeneración y neuroinflamación constituye un gran reto para la neurociencia actual (Wes et al., 2016).

La microglía es un tipo de célula del SNC encargada de mantener la homeostasis del tejido nervioso y de su protección frente a organismos o agentes considerados como patógenos (Stansley et al., 2012; Baltanás et al., 2013; Goldmann y Prinz, 2013; Šišková y Tremblay, 2013; Du et al., 2017; Wolf et al., 2017). Aunque existen numerosos estudios que versan sobre la microglía y sus funciones, aún se necesitan análisis más detallados para dilucidar los mecanismos de activación y señalización de este tipo celular en los procesos neurodegenerativos. Así, entender completamente la acción de la microglía en el contexto de una enfermedad ayudaría a identificar nuevos objetivos terapéuticos (Goldmann y Prinz, 2013). De hecho, las terapias basadas en la modulación de las células microgliales constituyen una estrategia muy novedosa para paliar algunos tipos de enfermedades neurodegenerativas (Kanazawa et al., 2017).

Hoy en día, existen gran cantidad de modelos animales que se utilizan para estudiar los procesos neurodegenerativos y de neuroinflamación que se producen en las distintas patologías nerviosas. En concreto, en la presente Tesis Doctoral se propone el uso del ratón mutante PCD (del inglés *Purkinje Cell Degeneration*), un modelo de neurodegeneración selectiva que aúna dos escenarios de muerte neuronal muy distintos en gravedad y extensión temporal, siendo excelente para el estudio de la neuroinflamación y, por ende, de la microglía (Peterson y Flood, 2012; Baltanás et al., 2013; Rauchmann et al., 2022).

La presente Tesis Doctoral comenzará con una introducción sobre la microglía donde se explicará su origen, sus diferentes tipos morfológicos junto con sus principales funciones, para acabar con una serie de fármacos inhibidores de la microglía utilizados en gran cantidad de patologías nerviosas. Por último, se hablará del modelo animal

Introducción

utilizado, el ratón mutante PCD. En concreto, se explicarán los procesos patológicos que ocurren en dicho modelo animal haciendo hincapié en las regiones nerviosas más afectadas, es decir, en el cerebelo y en el bulbo olfativo (BO).

La microglía

La microglía es un tipo celular del SNC que en los mamíferos constituye aproximadamente entre el 10-15% de todas sus células (Xavier et al., 2014; Warden et al., 2023). A pesar de que se considera una célula de tipo inmunológico, presenta una identidad única que la hace distinguible de los macrófagos o monocitos debido a su exposición temprana y perenne a un entorno nervioso determinado. En un estado fisiológico normal, la microglía presenta una morfología de “reposo” o de “vigilancia” de aspecto ramificado. En cambio, en condiciones patológicas, la microglía cambia su morfología hacia una morfología más ameboide considerándose como su estado “activado” (Baltanás et al., 2013; Mantovani et al., 2013; Du et al., 2017). En cada posible estado en el que se puedan encontrar, las células de microglía realizan gran cantidad de funciones muy importantes, desde la etapa embrionaria hasta la etapa adulta, que hacen posible que el SNC funcione correctamente. Por encima de todas ellas, destaca su función inmunitaria basada en que la microglía actúa como un agente defensivo frente a sustancias u organismos considerados como patógenos. Tanto es así, que se ha llegado a denominar a la microglía como el sistema inmunitario del SNC (Stansley et al., 2012; Wolf et al., 2017). Pero, aparte de su función inmunológica, la microglía se encarga de realizar otras funciones para mantener la homeostasis del SNC participando en la poda sináptica (Hong et al., 2016), en la formación de las espinas dendríticas (Nebeling et al., 2023), en la mielinización de los axones (McNamara et al., 2023) y en procesos relacionados con la vasculogénesis, la neurogénesis y la astrogénesis, entre otros (Stansley et al., 2012; Al-Onaizi et al., 2020).

A continuación, para un mejor entendimiento de la microglía, se realizará una breve descripción sobre su historia, su origen, sus diferentes tipos morfológicos y sus principales funciones para, por último, terminar hablando sobre algunos enfoques terapéuticos que tienen como objetivo la modulación de la microglía en enfermedades neurodegenerativas.

Historia de la microglía

En 1919, Pío del Río Hortega descubrió la microglía y formuló la siguiente cita que ha llegado hasta nuestros días: *“Como resultado de nuestra primera observación, estamos convencidos de que este nuevo tipo de célula es una célula glial y la llamamos microglía debido al diminuto tamaño de su soma, que es considerablemente más pequeño que el de los astrocitos. Sin embargo, la posterior suposición de que la microglía tiene un origen mesodérmico nos inspiró también a denominarlas mesoglia”* (Río-Hortega, 1919). Además, Pío del Río Hortega argumentó que la microglía era un tipo de célula que podía adoptar diferentes morfologías, pudiendo cambiar de un estado de reposo a uno activado donde era capaz de desarrollar capacidad fagocítica (Fig. 1; Sierra et al., 2016; Sierra et al., 2019).

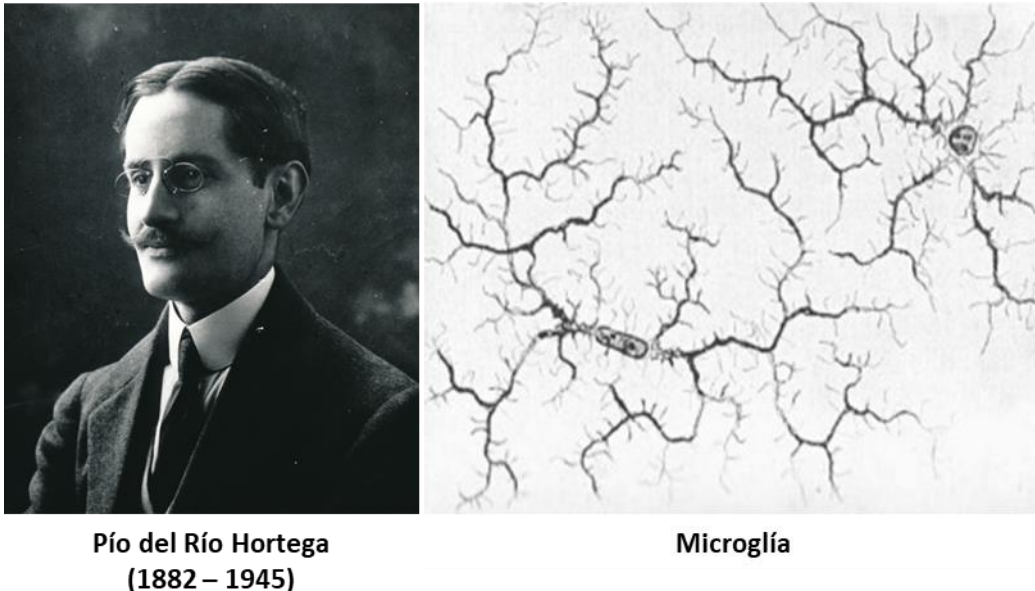


FIGURA 1. Breve biografía sobre Pío del Río Hortega. Pío del Río Hortega fue un médico e investigador español que nació en Portillo (Valladolid) el 5 de mayo de 1882 y murió en Buenos Aires el 1 de junio de 1945. Destacó en el campo de la histología, especialmente en el estudio del sistema nervioso. Su descubrimiento más importante fue el de la microglía gracias al uso de la técnica del tanino y de la plata que había ideado anteriormente Nicolás Achúcarro. Modificado de Tremblay et al., 2015 y Sierra et al., 2019.

Tras esta primera definición de la microglía, otros científicos corroboraron la presencia de estas células en diferentes especies animales, en diferentes regiones del encéfalo y en diferentes patologías. Por ejemplo, Wilder Penfield, al analizar tejidos que procedían de gliomas, observó y describió este tipo celular (Penfield, 1925). Por su parte, John

Introducción

Kershman observó la infiltración de microglía en el cerebro durante el desarrollo embrionario humano (Kershman, 1939).

A pesar de estas primeras investigaciones sobre la microglía, su interés científico se estancó durante unas décadas hasta que en 1968 fue revivido gracias a los estudios realizados por el grupo de Georg Kreutzberg quienes observaron que las células de microglía intervenían en el desplazamiento de los terminales sinápticos de motoneuronas cuando se encontraban durante un proceso de regeneración (Blinzinger y Kreutzberg, 1968). A partir de entonces, con el paso de los años, la microglía ha ido ganando más y más importancia en el ámbito científico llegando a ser una de las células del SNC más estudiadas en la actualidad.

Origen de la microglía

Desde su descubrimiento por Pío del Río Hortega, el origen histológico de la microglía ha sido objeto de debate (Ling, 1979). En concreto, se han propuesto hasta cinco procedencias diferentes para explicarlo (Fig. 2; Dermitzakis et al., 2023).

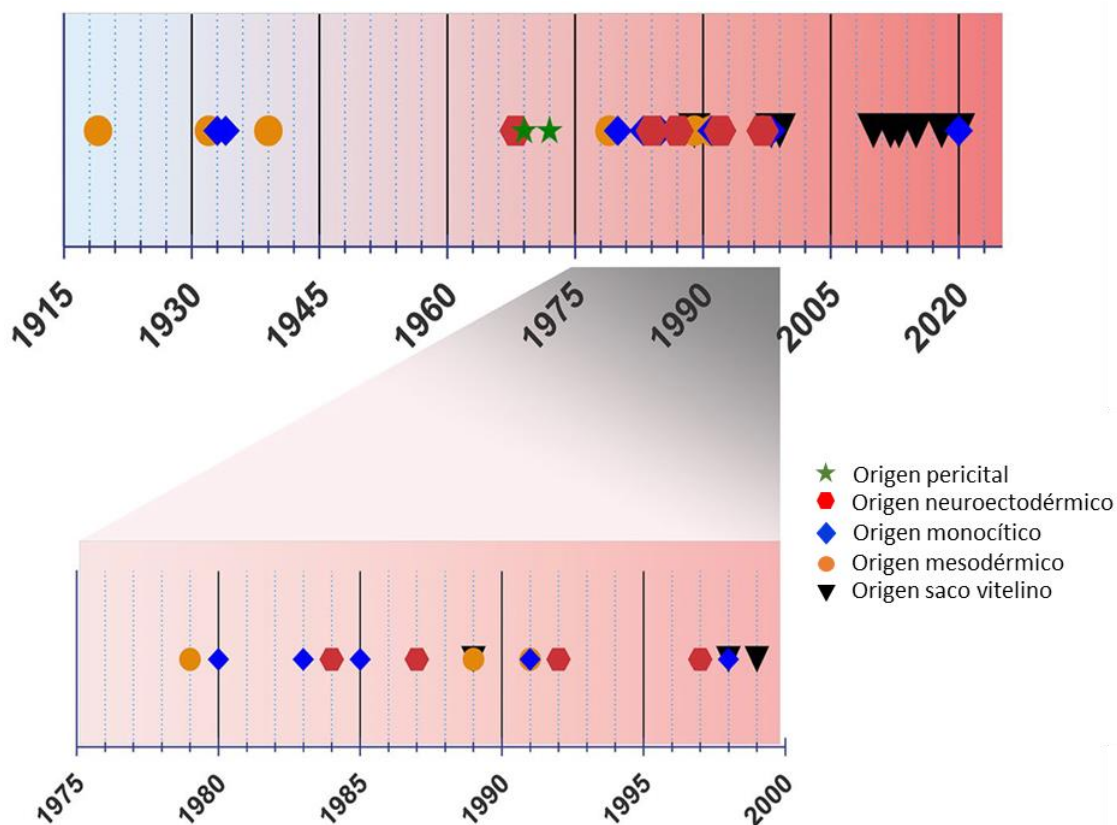


FIGURA 2. Cronología sobre el origen de la microglía desde su descubrimiento hasta la actualidad. A lo largo de los años, se propusieron diferentes orígenes hasta que, finalmente, se concluyó que la microglía provenía de precursores que se originaban desde el saco vitelino durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. Modificado de Dermitzakis et al., 2023.

En un inicio se consideró que la microglía podía provenir de los elementos maternos mesodérmicos, y después de células procedentes del neuroectodermo, de los pericitos o de monocitos que invadían el SNC durante estadios tempranos del desarrollo ([Fig. 2; Dermitzakis et al., 2023](#)). No fue hasta el año 1989 cuando se introdujo una nueva propuesta sobre el origen de la microglía que argumentaba que, en los mamíferos, este tipo celular se originaba a partir del saco vitelino durante el desarrollo embrionario ([Fig. 2; Takahashi et al., 1989](#)). Específicamente, en los roedores (modelo animal que se ha utilizado en la presente Tesis Doctoral) se descubrió que durante etapas muy tempranas del desarrollo embrionario (en concreto, los días embrionarios E8.5, E9.5, E14, E15, E16 y E17), las células de microglía se originaban a partir de precursores del saco vitelino que colonizaban el SNC viajando a través del torrente sanguíneo, los ventrículos cerebrales y las meninges ([Paolicelli et al., 2022](#)). Una vez dentro del SNC, la microglía, que durante esta etapa presenta una morfología ameboide, se distribuye de forma más o menos homogénea a través de todo el parénquima nervioso. Cuando cada célula de microglía ocupa su lugar definitivo, adquiere su clásica morfología ramificada con la que constantemente estará examinando y vigilando su entorno ([Wolf et al., 2017](#)). Al mismo tiempo, en torno a E13.5, la barrera hematoencefálica (BHE) empieza a formarse y provoca, con el tiempo, el aislamiento del SNC, impidiendo la llegada de nuevas células ([Fig. 3](#)). Por ello, una vez que la BHE se forma por completo, el aumento del número de células de microglía dentro del SNC se produce gracias a la proliferación local durante el final de la gestación, durante el desarrollo postnatal temprano y durante la etapa adulta. Hay que destacar que la proliferación en la etapa adulta es inusual, aunque existente, y suele ir ligada a procesos patológicos ([Orr et al., 2009; Morrison y Filosa, 2013; Hou et al., 2020](#)). Asimismo, desde el SNC se puede producir un reclutamiento de progenitores derivados de la médula ósea, complementando en cierta medida la población microglial ya existente ([Recio et al., 2011; Díaz et al., 2012](#)).

A E8.5 - E9.5:
Infiltración de la microglía en el SNC desde el saco vitelino

B E10 - E17: La microglía embrionaria y la BHE alcanzan su total funcionalidad

C E15 - E17:
Especialización regional de la microglía

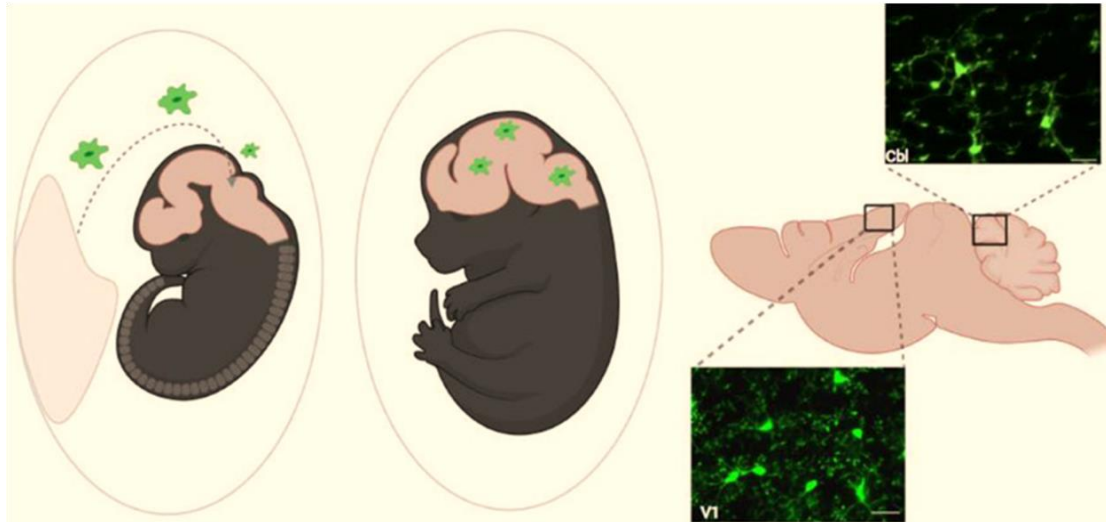


FIGURA 3. Infiltración de la microglía en el SNC de roedores. (A) La microglía se forma en el saco vitelino y se infiltra en el SNC durante el periodo embrionario comprendido entre los días E8.5 y E9.5 antes del cierre de la BHE. (B) Entre E10 y E17 la barrera hematoencefálica alcanza su plena funcionalidad y la microglía se distribuye por el SNC. (C) A partir de E15, la microglía comienza a especializarse para adaptarse a su microentorno local, adquiriendo una morfología más ramificada. BHE, barrera hematoencefálica; Cbl, microglía del cerebelo; V1, microglía de la corteza cerebral. Barras de escala 25 μm . Modificado de [Stoessel et al., 2021](#).

La microglía y sus diferentes estados morfológicos

Históricamente, la microglía se ha considerado una población celular muy homogénea con dos tipos de morfología posibles: morfología ramificada (asociada a un estado de “reposo” o de “vigilancia”) y morfología ameboide (asociada a un estado de “activación”). Sin embargo, con el paso de los años, se ha observado que la microglía es una célula que presenta una gran diversidad morfológica siendo capaz de modificar activamente la forma de sus procesos y soma en respuesta a diferentes estímulos. Por tanto, su clasificación no puede reducirse a una mera transición estructural de una forma ramificada a una ameboide, sino más bien a la adquisición de morfologías muy variables, dinámicas y complejas.

El tipo morfológico que la microglía adquiere en un determinado momento, en cierta medida, va a depender de la función que vaya a realizar. Por ello, en base a esta

característica, se han intentado establecer una serie de parámetros para agrupar y definir las diferentes morfologías de la microglía, como se mostrará a continuación.

Clasificación morfológica de la microglía

Como se ha comentado anteriormente, la definición de los dos estados microgliales (“en reposo” y “activado”), a pesar de no ser veraz a lo que sucede en la realidad, se ha utilizado durante muchos años para clasificar morfológicamente a la microglía. Según esta primera clasificación, por un lado, estaría la microglía en el denominado “estado de reposo” con una morfología ramificada y una actividad fagocítica, motilidad y proliferación bastante limitadas. Por otro lado, estaría la microglía en el denominado “estado activado” con una morfología ameboide y una gran capacidad fagocítica, de movilidad y proliferativa (**Fig. 4**).

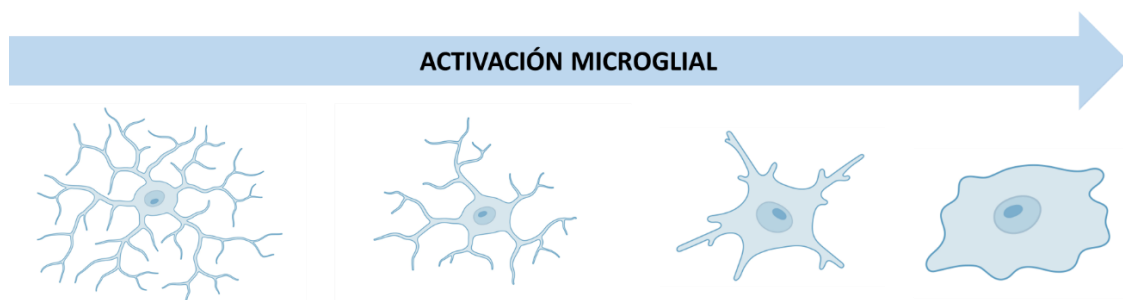


FIGURA 4. Visión clásica sobre la activación de la microglía desde un estado de “vigilancia” o “reposo” hacia un estado de “activación”. Por lo general, en condiciones fisiológicas, la microglía se encuentra en un estado de “vigilancia” o “reposo” donde adquiere una morfología ramificada. Sin embargo, en condiciones patológicas, la microglía cambia hacia un estado de “activación” donde adquiere una morfología más ameboide.

Esta clasificación tan simplista y equivocada (**Fig. 4**), ha contribuido a la idea errónea de que la microglía en un SNC sano se encuentra funcionalmente inactiva. Sin embargo, sucede todo lo contrario, ya que diversos estudios han demostrado que, en dicho estado, la microglía es muy dinámica y examina y se adapta a su entorno constantemente ([Du et al., 2017](#); [Vidal-Itriago et al., 2022](#)).

Para poder realizar una clasificación morfológica completa y veraz, se han utilizado diversos parámetros morfométricos: esfericidad, volumen, área del cuerpo celular, número de procesos, etc. Gracias a estos estudios se ha observado que los cambios morfológicos que se consideraron durante muchos años como el indicador clave de la "activación" de la microglía corresponden más bien a una transición morfofisiológica

Introducción

que refleja un cambio en la función. Gracias a ello, se han establecido una serie de patrones morfológicos que se han encontrado a lo largo del SNC en condiciones tanto fisiológicas como patológicas: microglía ramificada, microglía ameboide, microglía hiperramificada, microglía de bastón y microglía distrófica (**Fig. 5**).

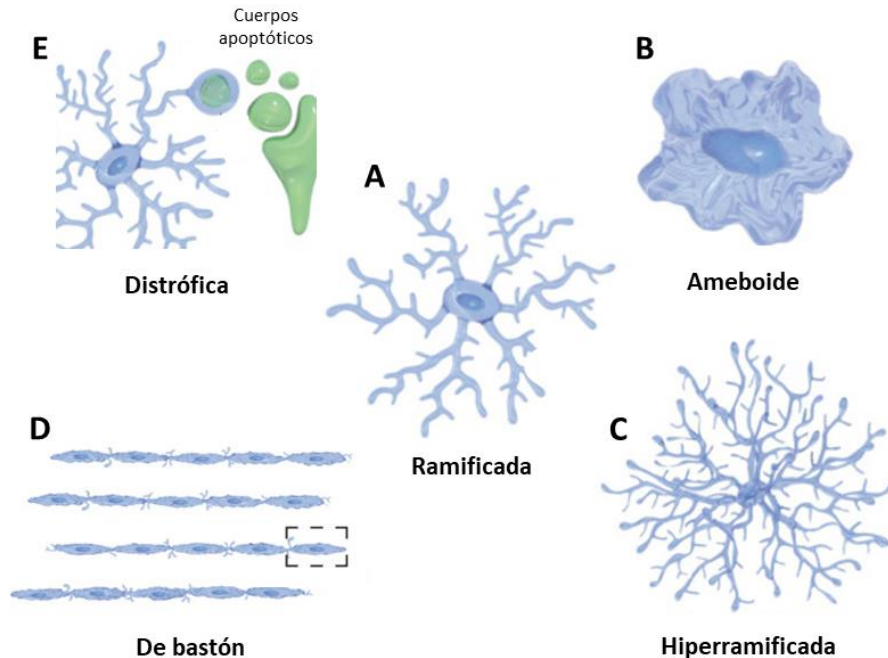


FIGURA 5. Diversidad morfológica de la microglía. (A) La microglía ramificada presenta múltiples procesos con ramificaciones de distinto orden. (B) La microglía ameboide presenta una morfología muy redondeada en comparación con sus estados ramificados. (C) La microglía hiperramificada presenta una mayor ramificación de sus procesos que la microglía ramificada normal. (D) La microglía de bastón se caracteriza por un soma alargado y estrecho sin procesos microgliales. (E) La microglía distrófica puede presentar estructuras esféricas en la punta de sus procesos debido a la acumulación de sustancias que han fagocitado. Modificado de [Vidal-Itriago et al., 2022](#).

Microglía ramificada

La microglía ramificada es el fenotipo microglial más común en el SNC adulto en condiciones fisiológicas normales. Cuando la microglía adquiere esta morfología se describe como “en reposo”, “quiescente” o “vigilante”; pero nada más lejos de la realidad, ya que estas células son increíblemente dinámicas y activas para mantener la homeostasis del SNC. Aunque sus somas suelen permanecer estáticos, sus procesos son muy móviles y se extienden y retraen constantemente observando, explorando y estableciendo contactos transitorios con otras células y estructuras del SNC (somas neuronales, astrocitos, oligodendrocitos, axones, espinas dendríticas, hendiduras

sinápticas y vasos sanguíneos, entre otras; [Davalos et al., 2005](#); [Nimmerjahn et al., 2005](#); [Tremblay et al., 2010](#); [Gu et al., 2023](#)).

Respecto a las funciones que puede llegar a desempeñar, se ha demostrado que la microglía ramificada interviene en la maduración neuronal, la transmisión sináptica y la presentación de antígenos ([Parakalan et al., 2012](#); [Dixon et al., 2021](#); [Mendes et al., 2021](#)).

Microglía ameboide

La microglía ameboide presenta una morfología muy similar a los macrófagos. Se trata de células redondeadas, con cuerpos celulares agrandados y con procesos microgliales muy reducidos o incluso ausentes ([Giulian et al., 1986](#); [Kaur y You, 2000](#)).

Por lo general, la microglía adquiere la morfología ameboide cuando se encuentra inmersa en una condición patológica ([Doorn et al., 2014](#); [Paasila et al., 2019](#)). Es decir, las células de microglía tras un daño cambian su morfología ramificada (correspondiente a un estado de “vigilancia”) a una morfología más ameboide (de estado de “activación”) para resolver un determinado proceso patológico. Sin embargo, la microglía no solo adquiere la morfología ameboide en estados patológicos, sino que en algunos estados fisiológicos también adquiere dicha morfología. En concreto, estudios previos demuestran que la microglía durante la etapa embrionaria presenta una morfología ameboide hasta el momento de establecerse en su lugar definitivo en el adulto, donde ya adquiere su clásica morfología ramificada ([Squarzone et al., 2014](#); [Tong y Vidyadaran, 2016](#); [Hagemeyer et al., 2017](#)).

Respecto a las funciones que puede desempeñar, se ha observado que la microglía ameboide interviene en la progresión del ciclo celular, en procesos de motilidad y migración celular y en procesos relacionados con la fagocitosis ([Parakalan et al., 2012](#); [Boche et al., 2013](#); [Vidal-Itriago et al., 2022](#)).

Microglía hiperramificada

La microglía hiperramificada presenta unos procesos microgliales cortos, gruesos e hiperramificados que suelen ir acompañados de un soma agrandado ([Ziebell et al., 2015](#)). Se considera que este tipo de microglía se encuentra en un estado de “hiperactivación” ya que estas células son capaces de ejercer una gran respuesta

Introducción

inflamatoria (Morrison et al., 2017). La producción de una respuesta inflamatoria exacerbada se debe básicamente a la exposición repetida a un estímulo nocivo determinado. La primera exposición a dicho estímulo provocaría una respuesta inflamatoria normal, pero una segunda exposición ocasionaría que la microglía respondiera de una forma más agresiva, rápida y exacerbada, provocando una respuesta inflamatoria desbocada (Vidal-Itriago et al., 2022).

Microglía de bastón

Las células de microglía con forma de bastón presentan núcleos muy pequeños sin apenas procesos microgliales. Sus somas presentan un aspecto alargado con sólo procesos bipolares orientados en una única dirección (Taylor et al., 2014).

Las principales funciones que desempeñan estos tipos celulares están relacionadas con los procesos de sinapsis donde separan físicamente los terminales axónicos presinápticos de sus objetivos postsinápticos (cuerpos celulares neuronales o dendritas proximales; Holloway et al., 2019; Vidal-Itriago et al., 2022).

Microglía distrófica

La microglía distrófica o senescente se caracteriza por presentar somas muy pequeños con procesos disfuncionales esféricos y agrandados formados por depósitos de sustancias que han fagocitado. La actividad de este tipo de microglía es prácticamente nula, ya que son células muy inactivas que apenas tienen capacidad para desencadenar una respuesta inflamatoria eficaz. Este tipo de microglía suele estar asociada a procesos neurodegenerativos y de envejecimiento (Shahidehpour et al., 2021; Vidal-Itriago et al., 2022; Neumann et al., 2023).

Factores que determinan la diversidad morfofisiológica de la microglía

Como se ha podido observar, la microglía presenta gran heterogeneidad morfológica principalmente debido a la función que adquiere en un determinado momento. Sin embargo, existen otros factores o condiciones que van a influir en su morfología entre los que destacan la región nerviosa, el sexo del individuo o la etapa del desarrollo en la

que se encuentre un organismo (Lawson et al., 1990; El Hajj et al., 2019; Tsyglakova et al., 2021; Colombo et al., 2022; Vidal-Itriago et al., 2022).

De todas ellas, el factor que más condiciona la adquisición de un tipo morfológico u otro es la región nerviosa en la que se encuentren las células de microglía (Lawson et al., 1990; Morrison et al., 2013; Tan et al., 2020; Tsyglakova et al., 2021; Colombo et al., 2022). Gracias a estudios inmunohistoquímicos, se han encontrado diferencias respecto a la densidad de las células de microglía y su morfología en las distintas regiones del SNC (Fig. 6; Lawson et al 1990; Baltanas et al., 2013; Morrison et al., 2013). Por un lado, se observó una densidad muy elevada en el BO, el hipocampo, los ganglios basales y la sustancia negra; una densidad media en la corteza cerebral, el tálamo y el hipotálamo; y una densidad bastante más reducida en el cerebelo, los tractos fibrosos y el tronco encefálico (Lawson et al., 1990; Savchenko et al., 1997; Baltanás et al., 2013). Asimismo, incluso dentro de una misma región nerviosa existen diferentes densidades microgliales, como ocurre en la corteza cerebelosa, donde se ha observado que hay una mayor densidad microglial en los núcleos cerebelosos profundos respecto la capa de los granos o la capa molecular (Lawson et al., 1990; Savchenko et al., 1997).

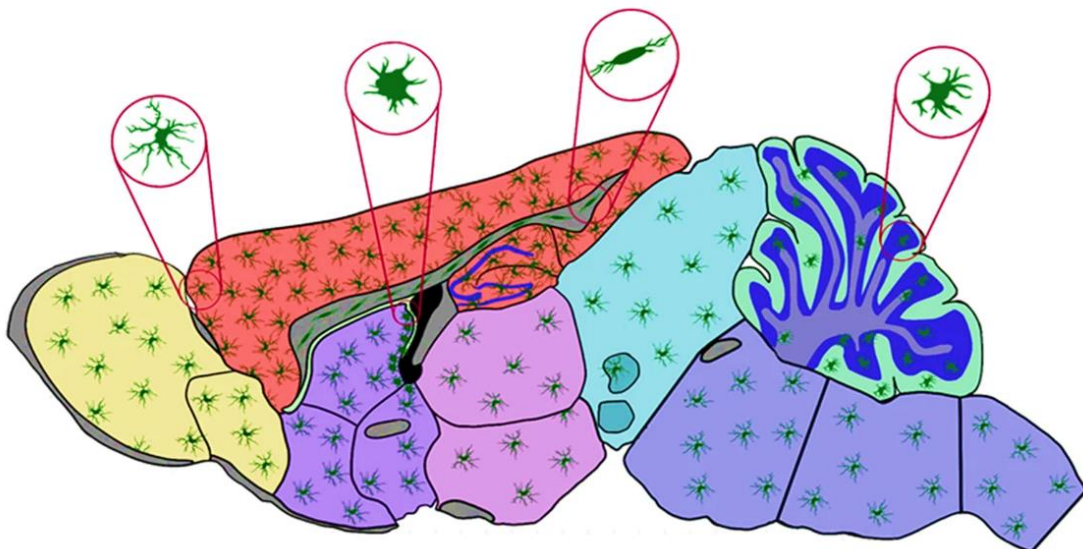


FIGURA 6. Heterogeneidad microglial debida a la región del SNC. Como se puede observar en esta ilustración de un encéfalo de un ratón adulto, existen diferentes densidades y morfologías microgliales en las diferentes estructuras que forman el SNC. Tomado de Tan et al., 2020.

Por otro lado, se han demostrado diferencias morfológicas en la microglía al comparar diferentes estructuras del SNC. Por ejemplo, la microglía presente en la sustancia gris del encéfalo se encuentra ampliamente ramificada, mientras que la que se encuentra en la sustancia blanca presenta una morfología más ameboide. Además, otros estudios

Introducción

demuestran que la microglía de la corteza cerebral está más ramificada que la microglía de otras regiones encefálicas tales como el cerebelo.

Por tanto, dependiendo de la región en la que nos encontremos, la microglía va a adquirir un tipo de morfología determinado con el fin de desarrollar una función específica.

La microglía y sus funciones

La microglía es la célula que se encarga de vigilar, proteger y mantener la homeostasis del SNC. Para ello, la microglía desempeña gran cantidad de funciones: respuesta inmunológica, sinaptogénesis (poda sináptica y formación de espinas dendríticas), mielinización de los axones, vasculogénesis, neurogénesis y astrogénesis, entre otras (**Fig. 7**; Antony et al., 2011; Stansley et al., 2012; Ginhoux et al., 2013; Nayak et al., 2014; Al-Onaizi et al., 2020; Verkhatsky et al., 2021; McNamara et al., 2023; Nebeling et al., 2023).

A continuación, se explicarán con más detalle las funciones más relevantes de esta lista.

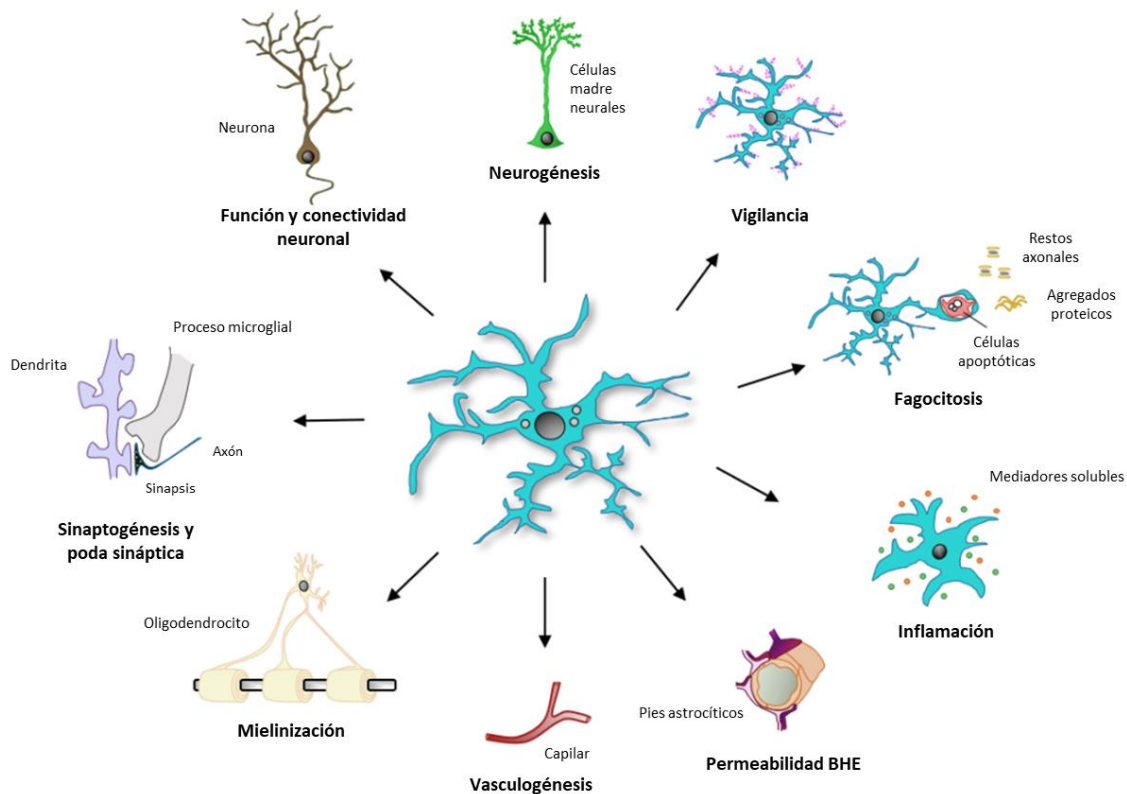


FIGURA 7. Principales funciones de la microglía y tipos celulares con los que interactúa. Como se muestra en la ilustración, la microglía desempeña gran cantidad de funciones muy diversas y heterogéneas. BHE, barrera hematoencefálica. Modificado de Sierra et al., 2019.

Respuesta inmunológica

Aunque otros tipos celulares intervienen en la respuesta inmunitaria del SNC, las células de microglía son las principales encargadas de realizar esta función. Tanto es así que, como ya se ha comentado, a la microglía se la considera el sistema inmunológico innato del encéfalo, siendo su principal función la de proteger al SNC de organismos o agentes (internos o externos) considerados como patógenos. Para responder rápidamente a estos estímulos patogénicos, las células de microglía están equipadas con receptores tipo Toll (TLR¹), que son receptores transmembrana caracterizados por un dominio extracelular de repetición rico en leucina que detectan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP²) o patrones moleculares asociados a daños (DAMP³; [Piccinini y Midwood, 2010](#); [Matzinger y Kamala, 2011](#)). Una vez que estos receptores se activan, desencadenan una cascada de transmisión intracelular que produce una respuesta inflamatoria ([Lalancette-Hébert et al., 2017](#)).

Entonces, por una parte, la microglía activa la secreción de diferentes sustancias o elementos relacionados con la inflamación (proinflamatorios o antiinflamatorios) y, por otra parte, la microglía activa su capacidad fagocítica junto con su gran capacidad móvil. Estas acciones persiguen la resolución de un determinado proceso patológico eliminando primero los estímulos nocivos, para más tarde iniciar un proceso de curación y restauración de las estructuras nerviosas dañadas ([Chen et al. 2018](#)).

La microglía puede desencadenar una potente respuesta inflamatoria al secretar determinados componentes inflamatorios en respuesta a estímulos nocivos. Entre estas sustancias se encuentran las citocinas, las quimiocinas y las especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno ([Takeuchi y Akira, 2010](#); [Griffith et al., 2014](#); [Zheng et al., 2016](#); [Hughes y Nibbs, 2018](#)).

Citocinas

Las citocinas son pequeñas proteínas que pueden ser producidas por las células de microglía para regular la respuesta inmunitaria ([Takeuchi y Akira, 2010](#); [Kany et al., 2019](#)). Estas proteínas se unen a sus receptores en células diana (neuronas y células

¹ Del inglés *Toll Like Receptors*.

² Del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*.

³ Del inglés *Damage-Associated Molecular Patterns*.

Introducción

gliales) y activan una cascada de señales intercelulares con las que regulan varias funciones tales como la adhesión, la supervivencia, la proliferación o la apoptosis celular (Milner y Campbell, 2002; Zhang y An, 2007; Ahuja y Lazar, 2021).

Las citocinas se dividen en dos grandes grupos: citocinas proinflamatorias y citocinas antiinflamatorias (Zhang y An, 2007). Las primeras facilitan la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel esencial tanto en el mantenimiento de la correcta fisiología del SNC como en su reparación tras un daño. Sin embargo, la liberación masiva e incontrolada de citocinas proinflamatorias es muy peligrosa ya que agrava la patología existente ocasionando un daño adicional al tejido nervioso circundante empeorando significativamente la progresión de la enfermedad (Zheng et al., 2016). Algunas de las citocinas proinflamatorias más destacadas en los procesos neurodegenerativos son la interleucina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α ⁴; Leal et al., 2013; Brás et al., 2020).

Por su parte, las citocinas antiinflamatorias se encargan de resolver y minimizar la respuesta proinflamatoria y de promover la reparación de los tejidos, evitando así los efectos negativos asociados a la inflamación crónica generada por una respuesta proinflamatoria descontrolada (Fenton et al., 1992; Vezzani et al., 2013). Entre las principales citocinas antiinflamatorias que se liberan en procesos neurodegenerativos se encuentran la interleucina 4 (IL-4), la interleucina 10 (IL-10) y el factor de crecimiento transformante β (TGF- β ⁵; Fenton et al., 1992; Bureta et al., 2019).

Quimiocinas y ejes de comunicación microglía-neurona

Las quimiocinas son una gran familia de pequeñas citocinas secretadas durante la respuesta inflamatoria (Griffith et al., 2014). En el SNC, su principal función es la de regular y controlar la motilidad de la microglía hacia el foco de un determinado proceso patológico mediante un proceso denominado quimiotaxis (Hughes y Nibbs, 2018). Más específicamente, se ha demostrado que la microglía presenta receptores para determinadas quimiocinas secretadas por neuronas, de manera que ambos tipos celulares están en constante comunicación, estableciéndose lo que se conoce como los

⁴ Del inglés *Tumor Necrosis Factor- α* .

⁵ Del inglés *Transforming Growth Factor- β* .

ejes de comunicación microglía-neurona, de gran importancia en los procesos neurodegenerativos (Eyo y Wu, 2013; Cserép et al., 2021).

La comunicación entre las neuronas y la microglía contribuye al correcto mantenimiento de la homeostasis del SNC. Se ha demostrado que esta interacción está mediada por "señales de encendido" (moléculas que desencadenan la activación microglial) y "señales de apagado" (moléculas que ejercen una inhibición microglial; Eyo y Wu, 2013; Posfai et al., 2019; Cserép et al., 2021). En concreto, el funcionamiento normal de los ejes de comunicación microglía-neurona se basa en la exhibición por parte de las neuronas de una serie de señales basadas en la secreción de quimiocinas que mantienen a la microglía en un estado de "inhibición" o "vigilancia". Sin embargo, cuando estos ejes de comunicación se alteran en respuesta a un determinado estímulo patológico, las neuronas eliminan ese control inhibitorio sobre la microglía. Esto hace que la microglía lo interprete como una amenaza o señal de peligro, activando así la respuesta inmunitaria con el objetivo de resolver un determinado estado patológico y de restablecer el correcto funcionamiento del eje de comunicación (Szepesi et al., 2018).

Existen diferentes tipos de ejes de comunicación microglía-neurona, pero los más destacados en patologías neurodegenerativas son los ejes CX3CL1⁶-CX3CR1⁷, CCL2⁸-CCR2⁹ y CD200¹⁰-CD200R¹¹.

Eje CX3CL1-CX3CR1

La quimiocina CX3CL1 se expresa de manera constitutiva y abundante en las neuronas, y de una forma minoritaria en otros tipos celulares tales como la microglía, los astrocitos y las células endoteliales. La actividad o función que va a desempeñar CX3CL1 se encuentra mediada por el receptor CX3CR1, que en el SNC solamente se expresa en la microglía. La interacción recíproca entre el receptor microglial CX3CR1 y el ligando neuronal CX3CL1 permite una comunicación precisa y eficaz entre las neuronas y las células microgliales y, por tanto, desempeña un papel clave en la coordinación de muchos aspectos de la fisiología nerviosa (establecimiento de redes neuronales, maduración y plasticidad de las sinapsis, regulación de la función cognitiva y control de

⁶ Del inglés *fractalkine/cx3c chemokine ligand 1*.

⁷ Del inglés *fractalkine/cx3c receptor 1*.

⁸ Del inglés *chemokine (c-c motif) ligand 2*.

⁹ Del inglés *chemoattractant receptor 2*.

¹⁰ Del inglés *cluster of differentiation 200*.

¹¹ Del inglés *cluster of differentiation receptor 200*.

Introducción

los procesos inmunológicos; [Pawelec et al., 2020](#)). Algunas investigaciones demuestran que, en condiciones normales, las neuronas producen altos niveles de CX3CL1 que se unen al receptor microglial CX3CR1 manteniendo a la microglía en un estado de “reposo” ([Pawelec et al., 2020](#)). Sin embargo, cuando se desarrolla una patología, los niveles de CX3CL1 secretados por las neuronas disminuyen, no llegando a unir a su receptor, lo que provoca una activación inmunitaria por parte de la microglía ([Luo et al., 2018](#); [Pawelec et al., 2020](#); [Zhao et al., 2023](#)).

Eje CCL2-CCR2

La quimioquina CCL2 es liberada por las neuronas y por las células de microglía ([Cherry et al., 2020](#)). Una vez que se libera, se une a su receptor CCR2 expresado también en neuronas y microglía ([Komiya et al., 2020](#)). CCL2 es un mediador clave en los procesos de inflamación de algunas enfermedades neurodegenerativas, donde la principal función de dicha quimioquina es la de atraer (quimiotaxis) células de carácter inmunitario (microglía y monocitos) hasta el lugar de la lesión. Más específicamente, en un proceso neurodegenerativo, las neuronas liberan CCL2 que se une al receptor CCR2 presente en la microglía. Esto provoca que la microglía libere más CCL2 para atraer al lugar de la lesión más células de microglía iniciando una cascada que perpetúa la inflamación y que puede agravar el daño neuronal. Asimismo, se ha observado que los niveles elevados de CCL2 alteran la excitabilidad, la plasticidad sináptica y el crecimiento de las neuritas generando cambios en la funcionalidad neuronal a largo plazo ([Komiya et al., 2020](#); [Sowa y Tokarski, 2021](#); [Wu et al., 2021](#)).

Eje CD200-CD200R

CD200 es una glicoproteína de membrana celular presente en gran cantidad de células entre las que se encuentran las neuronas ([Kotwica-Mojzych et al., 2021](#)). A lo largo de la última década se ha observado que la interacción de CD200 con su receptor CD200R, presente en la microglía, conduce a la atenuación de una serie de respuestas inmunitarias, interviniendo en procesos relacionados con la proliferación y activación microglial ([Zhao et al., 2019](#)).

Respecto a la proliferación, diversas investigaciones han demostrado que la interacción CD200-CD200R la reduce, ya que se ha observado que cuando hay una deficiencia en la producción de CD200 se produce un aumento drástico de la densidad microglial. En concreto, en las enfermedades neurodegenerativas se produce una descompensación

del eje CD200-CD200R disminuyendo los niveles de CD200 y, por ende, estimulando la proliferación de la microglía (Wang et al. 2011; Oria et al. 2018).

Respecto a la activación inmunológica, se ha observado que la interacción CD200-CD200R mantiene la microglía en estado de reposo impidiendo, a su vez, que libere mediadores proinflamatorios (Hoek et al., 2000; Hernangómez et al., 2014; Lago et al., 2018). Sin embargo, en un estado patológico dicha interacción se rompe, haciendo que la microglía se active produciendo una respuesta inflamatoria.

Especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS¹²) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS¹³) son moléculas derivadas del oxígeno y del óxido nítrico, respectivamente. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS¹⁴) incluyen el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el óxido nítrico (NO) y el peroxinitrito ($OONO^-$). Todas ellas actúan como moléculas de señalización celular en procesos biológicos normales tales como la supervivencia celular, la muerte celular, la diferenciación genética o la transcripción de genes. Sin embargo, en condiciones patológicas pueden provocar daños en múltiples orgánulos y/o en determinados procesos celulares (Kumar y Ratan, 2016; Manoharan et al., 2016; Simpson y Oliver, 2020; Fan et al., 2023).

Fagocitosis

Mediante el proceso de fagocitosis la microglia reconoce, engulle y degrada partículas mayores de 0,5 μm como microorganismos, sustancias extrañas, células apoptóticas, restos axonales o espinas dendríticas (Jana et al., 2008; Abiega et al., 2016; Diaz-Aparicio et al., 2016; Yanguas-Casás et al., 2018; Diaz-Aparicio et al., 2020; Uribe Querol y Rosales, 2020; Yanguas-Casás et al., 2020).

En el SNC, a pesar de que otros tipos celulares como los astrocitos presentan capacidad fagocítica, se considera a la microglía como la célula fagocítica por excelencia, ya que es la más eficiente para dicho propósito (Parnaik et al., 2000; Magnus et al., 2002; Nayak et al., 2014).

¹² Del inglés *Reactive Oxygen Species*.

¹³ Del inglés *Reactive Nitrogen Species*.

¹⁴ Del inglés *Reactive Oxygen and Nitrogen Species*.

Motilidad

Durante un estado fisiológico normal la microglía presenta la denominada motilidad de “vigilancia”, que se define por la extensión, retracción y movimiento de los procesos microgliales, sin migración del cuerpo celular. Este tipo de movimiento permite a la microglía examinar su entorno, eliminar restos celulares, interactuar con neuronas y otros componentes gliales, y remodelar la matriz extracelular neuronal (Bernier et al., 2019; Franco-Bocanegra et al., 2019; Nebeling et al., 2023).

Sin embargo, durante un proceso patológico la microglía cambia su motilidad de vigilancia hacia una motilidad “dirigida” o “quimiotáctica”. Cuando la microglía adquiere este tipo de motilidad puede presentar dos tipos de movimientos: por un lado, extiende sus procesos microgliales hacia la fuente de la lesión y, por otro lado, también dirige su soma hacia el lugar de la lesión, aunque a un ritmo más lento que los procesos. Este último tipo de motilidad se asocia a un fenotipo de carácter proinflamatorio con marcada capacidad fagocítica (Franco-Bocanegra et al. 2019; Nebeling et al., 2023).

Neurogénesis

La microglía participa de forma activa en los procesos de neurogénesis durante las etapas embrionaria y adulta (Sierra et al., 2010; Cunningham et al., 2013; Tong et al., 2016; Diaz-Aparicio et al., 2020; Hattori et al., 2023).

Haciendo hincapié en la última, la microglía que se encuentra en los nichos neurogénicos de la zona subventricular y la zona subgranular del giro dentado posibilita la producción de neuronas que se integran en el BO y en el hipocampo, respectivamente (Sierra et al., 2010). Más específicamente, la microglía recibe señales desde los nichos neurogénicos que hacen que fagocite las células madre neurales apoptóticas generadas durante la neurogénesis y también que elimine el exceso de células progenitoras recién formadas (Sierra et al., 2010; Li et al., 2013; Arno et al., 2014). Pero no siempre la microglía actúa a favor de la neurogénesis, sino que en determinadas condiciones fisiopatológicas la microglía libera citocinas proinflamatorias que la inhiben (Wu et al., 2012; Fang et al., 2023).

Vasculogénesis

La microglía desempeña un papel importante en la angiogénesis y el mantenimiento de la vasculatura del SNC (Ding et al., 2018; Zhao et al., 2018). Además, la microglía interviene en la remodelación y en la formación de nuevos vasos sanguíneos en determinadas patologías relacionadas con el sistema nervioso (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, enfermedades priónicas o glioblastomas; Ding et al., 2018; Zhao et al., 2018).

Astrogénesis

La microglía participa en la producción de nuevos astrocitos (astrogénesis) mediante la activación de vías de señalización específicas (Matejuk y Ransohoff, 2020). Asimismo, en un estado patológico, la producción de mediadores proinflamatorios por parte de la microglía induce la aparición de astrocitos reactivos que intervienen y participan de forma activa en la reacción inflamatoria mediante la producción de sustancias inflamatorias (Baltanás et al., 2013; Liu et al., 2020).

Sinaptogénesis: poda sináptica y formación de espinas dendríticas

La microglía contribuye a la formación, maduración y eliminación de las sinapsis e interviene en los procesos de plasticidad sináptica. Durante el desarrollo postnatal, la microglía elimina las neuronas redundantes que no establecen circuitos funcionales y, además, da forma a las sinapsis neuronales fagocitando espinas dendríticas que no reciben información de los contactos sinápticos (Kettenmann et al., 2013; Colonna et al., 2017). Más aún, la microglía influye en la fuerza y plasticidad de las sinapsis mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias, ROS y NO, así como factores neurotróficos (Prowse 2021; Cornell et al., 2022).

Mielinización

La microglía participa activamente en los procesos de mielinización al producir factores de crecimiento que regulan la proliferación, supervivencia y destino de los oligodendrocitos. Además, durante los procesos de mielinización y de remielinización,

Introducción

la microglía fagocita los restos de mielina, lo que facilita el reclutamiento y la diferenciación de los precursores de oligodendrocitos (Santos y Fields, 2021).

Por su parte, hay que resaltar que, en condiciones patológicas, la microglía podría tener un papel negativo en la mielinización de los axones, ya que la liberación de citoquinas proinflamatorias dificultaría dicho proceso (Santos y Fields, 2021).

La microglía como diana terapéutica en enfermedades neurodegenerativas: los inhibidores de la microglía

Existen pruebas sólidas que sugieren que la regulación de las funciones de la microglía durante una patología neurodegenerativa podría representar una estrategia terapéutica prometedora que ayudaría a contrarrestar la muerte neuronal. Por tanto, comprender el funcionamiento de la microglía en los procesos neurodegenerativos es fundamental para el establecimiento de estas terapias.

Por lo general, dichas terapias se fundamentan en la idea de que la activación de la microglía hacia un estado proinflamatorio es perjudicial, mientras que la transición hacia un estado antiinflamatorio es beneficiosa. Por tanto, a lo largo de los años se han desarrollado estrategias enfocadas en la conversión de la microglía de un fenotipo proinflamatorio hacia uno antiinflamatorio (Sun et al., 2010; Pettit et al., 2013; Pérez-Martín et al., 2023). Sin embargo, con el paso del tiempo se ha observado que este tipo de terapia no es totalmente efectiva, ya que en las enfermedades neurodegenerativas el paradigma de polarización proinflamatorio/antiinflamatorio es equívoco dado que ambos estados suelen converger al mismo tiempo. Además, como se ha comentado con anterioridad, la activación proinflamatoria no siempre es perjudicial, ni la activación antiinflamatoria es siempre beneficiosa.

Recientemente, ha surgido una nueva línea de investigación basada en el uso de inhibidores de la microglía. En primer lugar, estos inhibidores otorgan información muy valiosa sobre el funcionamiento de la microglía durante los procesos fisiológicos y patológicos del SNC (Basilico et al. 2022). Además, en diversas investigaciones recientes se ha observado que este tipo de intervención presenta un potencial terapéutico en enfermedades neurodegenerativas en las que la microglía promueve la inflamación y/o la muerte neuronal. Así, en algunas enfermedades relacionadas con el SNC, eliminar o

reducir la microglía resulta beneficioso para la resolución o mejora de una determinada patología (Lund et al., 2017; Sosna et al., 2018; Kerkhofs et al., 2020; Henry et al., 2020; Henry y Loane, 2021). Se piensa que este hecho se debe a la disminución de la inflamación generada por la microglía en respuesta a un determinado estímulo nocivo (Henry et al., 2020; Kerkhofs et al., 2020). Por ello, se podría considerar que una adecuada modulación de la microglía constituye un enfoque terapéutico muy importante para prevenir y/o limitar la progresión de la enfermedad (Basílico et al., 2022). Sin embargo, esta inhibición es generalizada y no sólo afecta a la microglía perjudicial. Por esta razón, tales aproximaciones terapéuticas, aunque perfectamente válidas, entrañan ciertos riesgos o potenciales efectos secundarios.

En la actualidad existen dos formas muy eficaces de eliminar la microglía: mediante el silenciamiento génico o mediante el uso de fármacos.

Eliminación de la microglía mediante silenciamiento génico

Una de las formas más utilizadas a lo largo de los años para la depleción de la microglía es el denominado silenciamiento génico. Con esta técnica se busca silenciar genes microgliales o relacionados con algunas funciones microgliales esenciales. A lo largo de los años se han diseñado estrategias para dicho fin, entre las que destacan el uso de ratones transgénicos CD11b-HSVTK, el uso de ratones transgénicos portadores de mutaciones en genes críticos para el desarrollo de la microglía (factor de transcripción PU.1, factor regulador del interferón 8, TGF- β) y el uso de ratones transgénicos basados en la toxina diftérica (Heppner et al., 2005; Parkhurst et al., 2013; Bruttger et al., 2015; Basílico et al., 2022). Todas estas estrategias han sido ampliamente usadas a lo largo de los años para el estudio de la microglía y sus funciones en las diferentes etapas del desarrollo de un organismo, pero con el tiempo han surgido nuevos métodos más innovadores, de más fácil administración y más económicos: los denominados fármacos inhibidores de la microglía (Basílico et al., 2022).

Eliminación de la microglía mediante el uso de fármacos inhibidores

Además de las herramientas genéticas, se dispone de estrategias farmacológicas para la depleción de la microglía (Yao et al., 2016; Hou et al., 2020; Stojiljkovic et al., 2022; Church et al., 2023).

Introducción

De todas ellas, destaca el uso de los inhibidores del receptor 1 del factor estimulante de colonias (CSF-1R¹⁵), receptor esencial para la proliferación, diferenciación y supervivencia microglial (Stanley et al., 1997; Hu et al., 2021; Elmore et al., 2014).

Se han desarrollado una serie de inhibidores del receptor CSF-1R, siendo los dos más conocidos los inhibidores PLX3397 y PLX5622 (Elmore et al., 2014; Stojiljkovic et al., 2022; Church et al., 2023). Más aún, el inhibidor PLX5622 es el más utilizado hasta la fecha, ya que se trata del más eficaz y rápido para inhibir la microglía de una forma prácticamente completa (Fig. 8).

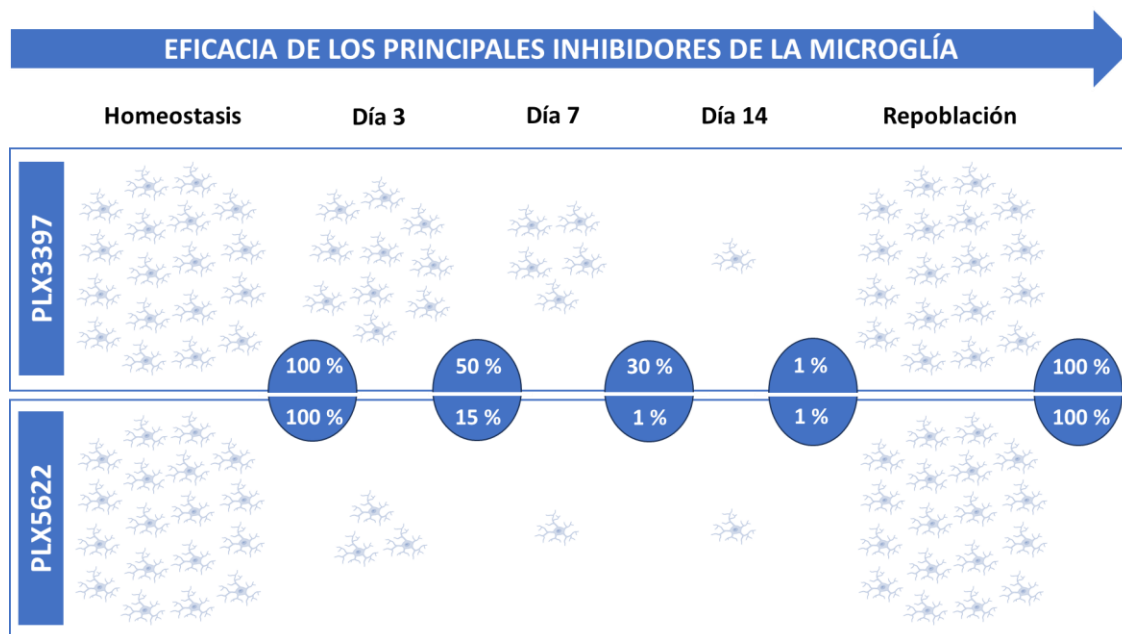


FIGURA 8. Dinámica temporal de la depleción y repoblación de la microglía. Evolución temporal de la eliminación de la microglía durante la administración de los inhibidores PLX3397 y PLX5622 y su posterior repoblación tras la retirada del tratamiento. Modificado de Basilico et al., 2022.

PLX5622 es un inhibidor del CSF-1R altamente selectivo que permite una eliminación prolongada y específica de la microglía, antes y durante el desarrollo de una patología. Este fármaco penetra fácilmente a través de la BHE llegando a eliminar más del 90% de la microglía en tan sólo tres días (Fig. 8; Carroll et al., 2018; Ali et al., 2020; Basilico et al., 2022; Stojiljkovic et al., 2022; Church et al., 2023).

Existen diferentes formas de administrar este inhibidor, siendo la oral, mediante la dieta, en forma de pienso, la forma más estandarizada (Ali et al., 2020; Basilico et al., 2022; Arbaizar-Roviroa et al., 2023). Este tipo de administración provoca una pérdida de alrededor del 80% de microglía tras 3 días de tratamiento y una pérdida del 99% de

¹⁵ Del inglés *Colonies Stimulating Factor Receptor type 1*.

microglía tras 3 semanas de tratamiento en regiones del SNC tales como la corteza cerebral, el cuerpo estriado, el hipocampo o el cerebelo de ratones adultos. Otra vía de administración es la intraperitoneal, mediante el uso de determinados vehículos de administración (como aceite de maíz), donde el compuesto se solubiliza y se administra mediante una inyección. Se ha observado que una sola inyección intraperitoneal de PLX5622 al día reduce la microglía en un 80-90% a los 3 días del inicio del tratamiento, alcanzando una reducción del 96% tras 14 días de administración (Riquier y Sollars, 2020).

Por tanto, el inhibidor PLX5622 presenta una gran eficacia para eliminar la microglía, aunque este tipo de inhibidor también presenta algunas limitaciones o inconvenientes. Su administración no es específica, por lo que no se dirige a una región encefálica determinada. Además, su administración produce efectos fuera del SNC y afecta a otros tipos celulares como los monocitos o a algunas poblaciones de células mieloides y linfoides periféricas y causa cambios irreversibles en la composición de la médula ósea, del bazo y de la sangre (Lei et al., 2020). A pesar de estas limitaciones, el inhibidor PLX5622 se sigue empleando ampliamente para la eliminación de la microglía en estudios preclínicos de una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas debido a su facilidad de uso, su fácil administración y su gran eficacia.

El ratón PCD como modelo de neurodegeneración y neuroinflamación selectiva

A lo largo de los años, el estudio de modelos animales portadores de una determinada mutación ha proporcionado información muy valiosa acerca de los estados fisiológicos y patológicos en los que se puede encontrar un organismo (Fernández-González et al., 2002). En neurociencia, el uso de estos animales ayuda a comprender los procesos fisiopatológicos que ocurren en gran cantidad de patologías nerviosas y, además, posibilitan el ensayo de nuevas terapias.

En la presente Tesis Doctoral se ha empleado un modelo animal de neurodegeneración y neuroinflamación selectiva, el ratón mutante PCD. Este animal se caracteriza por sufrir una pérdida selectiva y postnatal de las células de Purkinje del cerebelo y de las células mitrales del BO (Mullen et al., 1976; Greer y Shepherd, 1982; Wang y Morgan, 2007).

Introducción

Como resultado, se produce una atrofia de ambas regiones encefálicas, junto con una reacción inflamatoria y una alteración de las funciones cerebelosas y olfativas (Mullen et al., 1976; Greer y Shepherd, 1982; Díaz et al., 2012; Baltanás et al., 2013; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Del Pilar et al., 2021; Pérez-Martín et al., 2021).

A continuación, para una mejor comprensión de este modelo de estudio, de forma general, se explicará la propia mutación *pcd* y los procesos de neurodegeneración y neuroinflamación que se producen asociados a la misma. En capítulos aparte, se profundizará sobre las dos regiones encefálicas más afectadas en el ratón PCD, el cerebelo y el BO, atendiendo a su estructura general, a las particularidades de su microglía y a los efectos específicos de la mutación *pcd*.

La mutación *pcd*

La mutación *pcd*¹¹ se describió por primera vez en el año 1976 (Mullen et al., 1976). Se trata de una mutación autosómica recesiva originada de forma espontánea en la estirpe de ratón C57BR/cdJ en los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, Massachusetts, EE. UU.) y que posteriormente se transfirió a la estirpe C57BL/6J (Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002). Respecto a su localización cromosómica, se ha observado que en los ratones la mutación se encuentra en el cromosoma 13, mientras que su equivalente en los seres humanos está en el cromosoma 9 (Mullen et al., 1976; Lalonde y Strazielle, 2022). A lo largo de los años, el gen afectado por la mutación *pcd* ha recibido diferentes nombres: *Nna1*¹⁶ por su papel y localización en estudios sobre regeneración axonal, *Agtpbp1*¹⁷ por la unión ATP/GTP que presenta en su estructura, y *Ccp1*¹⁸ por su función como carboxipeptidasa (Harris et al., 2000). En la presente Tesis Doctoral se utilizará la nomenclatura *Ccp1* por hacer referencia a su función carboxipeptidasa relacionada con la estabilización del citoesqueleto, estudiada previamente en nuestro laboratorio (Muñoz-Castañeda et al., 2018; Hernández-Pérez, 2022).

Así pues, el ratón PCD presenta una mutación en el gen *Ccp1* que codifica para la enzima CCP1. Esta enzima se encarga de realizar modificaciones postraduccionales de los microtúbulos eliminando los residuos de ácido glutámico del extremo C-terminal de las

¹⁶ Del inglés *Nervous system Nuclear protein induced by Axotomy 1*.

¹⁷ Del inglés *AGT/GTP Biding Protein 1*.

¹⁸ Del inglés *Cytosolic Carboxypeptidase 1*.

tubulinas (Kalinina et al., 2007; Rogowski et al., 2010; Berezniuk et al., 2013; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Hernández-Pérez, 2022), por lo que la ausencia de la actividad glutamilasa de la CCP1 altera la estructura y dinámica de los microtúbulos al estar hiperglutamilados (Rogowski et al., 2010; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Pang et al., 2023). Además, la enzima CCP1 se encarga de proporcionar estabilidad a los cromosomas (Baltanás et al., 2011), mantener la estructura y organización del nucleolo (Baltanás et al., 2019), mantener la dinámica y el metabolismo energético mitocondrial (Gilmore-Hall et al., 2019), así como de participar en procesos de fusión (Gilmore-Hall et al., 2019) y de diferenciación celular (Ye et al., 2018).

Hasta el momento se han identificado alrededor de 25 alelos distintos de la mutación *pcd* en diferentes cepas de ratón; algunos han surgido espontáneamente, mientras que otros se han generado químicamente o mediante mutagénesis dirigida (Baltanás et al., 2021). En esta Tesis Doctoral se ha empleado el ratón portador de la mutación original denominada *pcd^{fl}* ya que es la variante que presenta los estados patológicos más acusados (Fernández-González et al., 2002; Wang y Morgan, 2007).

Patrones de expresión del gen *Ccp1*

Diversas investigaciones han demostrado que el gen *Ccp1* puede detectarse en prácticamente todas las células, tejidos y órganos. En concreto, según el conjunto de datos presentes en la base de datos “Human Protein Atlas” obtenidos a partir de análisis transcriptómicos de diferentes tejidos y órganos, se ha observado una expresión génica muy elevada del gen *Ccp1* en la médula ósea y en regiones del SNC como la médula espinal, la protuberancia, el cerebelo, el hipocampo, el BO, la retina y el tálamo (Baltanás et al., 2021). Dentro de estas estructuras nerviosas, los tipos celulares donde más se expresa dicho gen son las células de Purkinje del cerebelo, las células mitrales del BO, determinadas neuronas talámicas y los fotorreceptores de la retina. Además, cabe resaltar que también existe una expresión muy elevada del gen *Ccp1* en los espermatozoides (Fig. 9; Mullen et al., 1976; Fernández-González et al., 2002; Baltanás et al., 2013; Baltanás et al., 2021). Adicionalmente, el gen *Ccp1* también se expresa en células relacionadas con el sistema inmunitario (microglía, monocitos, macrófagos y células NK), pero, según nuestro conocimiento, no existen investigaciones al respecto.

RNA single cell type specificity

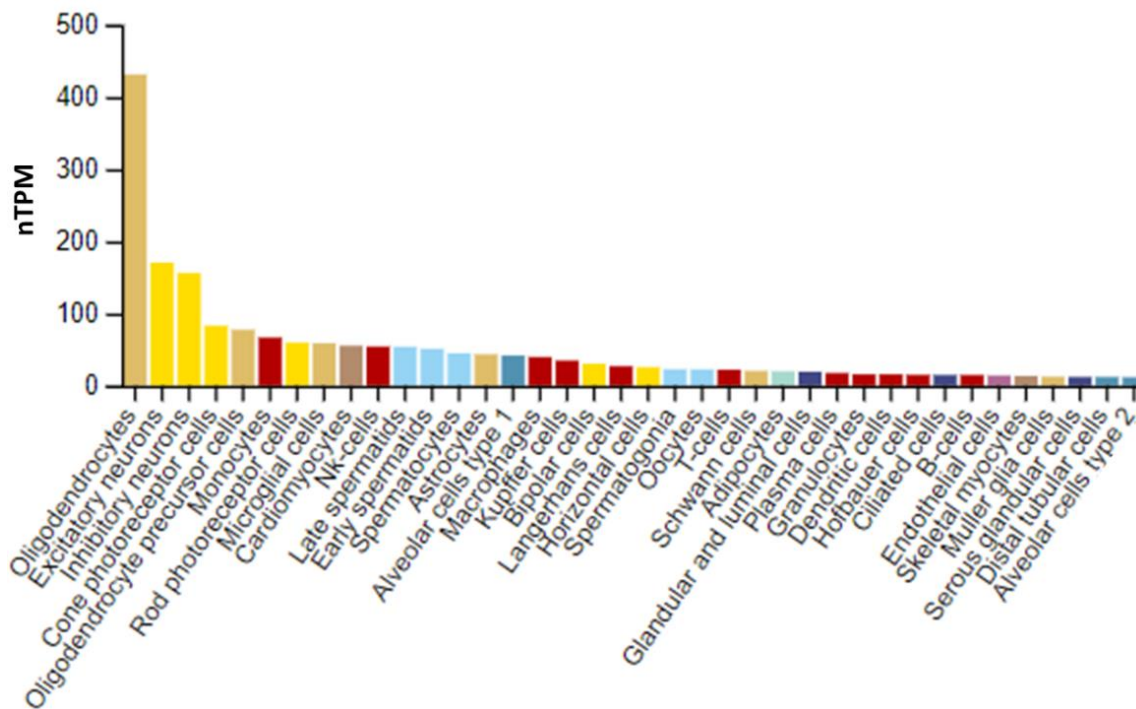


FIGURA 9. Niveles de expresión de *Ccp1* en diferentes tipos celulares del organismo donde este gen se expresa de una forma mayoritaria. Se observa una mayor expresión del gen *Ccp1* en células gliales (oligodendrocitos y microglía), en células neuronales (neuronas excitatorias o inhibitorias) y en células relacionadas con el sistema inmunitario (monocitos, células NK y macrófagos). Los diferentes tipos celulares están ordenados por nivel de expresión del gen *Ccp1* de mayor a menor. nTPM, transcritos por millón. Tomado de <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135049-AGTPBP1/single+cell+type>.

Efectos de la mutación *pcd* en el organismo

Como cabría esperar, en el ratón PCD los efectos más acusados debidos a la falta de expresión del gen *Ccp1* los sufren los tipos celulares que más deberían expresar de forma constitutiva dicho gen. En concreto, se ha demostrado que la ausencia de expresión del gen *Ccp1* produce un funcionamiento anómalo y/o la muerte de las células de Purkinje del cerebelo, de las células mitrales del BO, de diversas neuronas talámicas, de los fotorreceptores de la retina y de los espermatozoides.

La degeneración de las células de Purkinje es la más temprana y rápida, y la primera en ser descubierta; por ello es la que da nombre al modelo. Esta degeneración tiene lugar entre la tercera y cuarta semana de vida, produciéndose el pico de máxima neurodegeneración en torno a (P25), y de manera que a P40 ha muerto la práctica totalidad de estas neuronas (Landis y Mullen, 1978). Este hecho provoca una ataxia cerebelosa grave que constituye el rasgo fenotípico más llamativo de los ratones PCD

(Landis y Mullen, 1978). De una forma más tardía se produce la degeneración de las células mitrales del BO, entre el segundo y el cuarto mes de vida postnatal, produciéndose el pico de máxima neurodegeneración en torno a P70, y concluyendo en torno a P110 (Greer y Shepherd, 1982; Valero et al., 2006). Este fenómeno conduce al desarrollo de una hiposmia, que se caracteriza por una disminución de la capacidad de detección y de discriminación olfativas (Díaz et al., 2012). Por su parte, determinadas poblaciones neuronales presentes en los núcleos talámicos comienzan a degenerar a P50, permaneciendo tan solo el 10 % de estas células a P90 (O'Gorman y Sidman, 1985). Finalmente, la muerte de los fotorreceptores transcurre de manera lenta y gradual a lo largo aproximadamente de un año (Blanks et al., 1982; LaVail et al., 1982; Blanks y Spee, 1992; Marchena et al., 2011). Respecto al sistema reproductor, la mutación en el gen *Ccp1* ocasiona que los ratones PCD produzcan muy pocos espermatozoides, con una morfología y motilidad anormal, haciendo que los machos sean estériles (Mullen et al., 1976; Handel y Dawson, 1981; Kim et al., 2011).

Nuevas investigaciones muy recientes han identificado la mutación *pcd* en humanos dando lugar a una enfermedad nerviosa que se la ha denominado como CONDCA (neurodegeneración de inicio en la infancia con atrofia cerebelosa; Shashi et al., 2018; Karakaya et al., 2019; Sheffer et al., 2019; Baltanás et al., 2021). Se han identificado variantes bialélicas del gen AGTPBP1 (nomenclatura que recibe en humanos) que causan una serie de procesos neurodegenerativos asociados a la pérdida de la función de la proteína AGTPBP1 (Baltanás et al., 2021). Los pacientes con CONDCA presentan deterioro cognitivo progresivo, ataxia, hipotonía o debilidad muscular, entre otras patologías que recuerdan a las sufridas por el ratón mutante PCD (Shashi et al., 2018; Karakaya et al., 2019; Sheffer et al., 2019; Baltanás et al. 2021).

El cerebelo

Características anatómicas y citoarquitectura

El cerebelo es una estructura nerviosa que forma parte del SNC y que en los mamíferos cuadrúpedos se localiza en la región más dorso-caudal del encéfalo.

Introducción

A nivel anatómico, el cerebelo presenta dos regiones laterales bien diferenciadas que se denominan hemisferios cerebelosos (**Fig. 10**; Sillitoe y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013; Amore et al., 2021; Hernández-Pérez et al., 2023). Ambos hemisferios se encuentran separados por una región central que se denomina vermis cerebeloso. Las regiones más próximas al vermis, que se encuentran a ambos lados, reciben el nombre de zonas intermedias o paravermis. Por su parte, las zonas más laterales del cerebelo se denominan flóculos o paraflóculos (**Fig. 10**; Sillitoe y Joyner, 2007; White y Sillitoe, 2013; Amore et al., 2021; Hernández-Pérez et al., 2023).

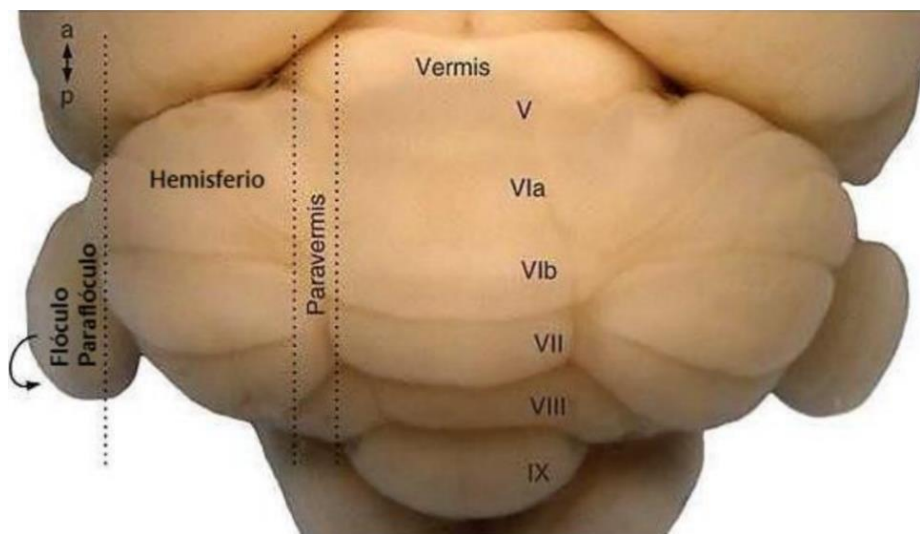


FIGURA 10. Cerebelo de un ratón adulto observado dorsalmente. Desde la zona más medial de la imagen a la más lateral, se puede observar el vermis, las zonas intermedias (paravermis), los hemisferios, los paraflóculos y los flóculos cerebelosos. Asimismo, a simple vista, se pueden observar algunos de los lóbulos cerebelosos (V, VI, VII, VIII y IX). A, anterior; p, posterior. Modificado de White y Sillitoe, 2013.

Si se observa la superficie externa del cerebelo, se puede apreciar una serie de surcos o fisuras que dividen la corteza cerebelosa en diferentes lóbulos (**Fig. 10**; Sillitoe y Joyner, 2013; Amore et al., 2021). Específicamente, en un plano parasagital del vermis cerebeloso se distinguen diez lóbulos que se enumeran con números romanos del I al X desde la región más anterior a la región más posterior (**Fig. 11**; White y Sillitoe, 2013; Amore et al., 2021).

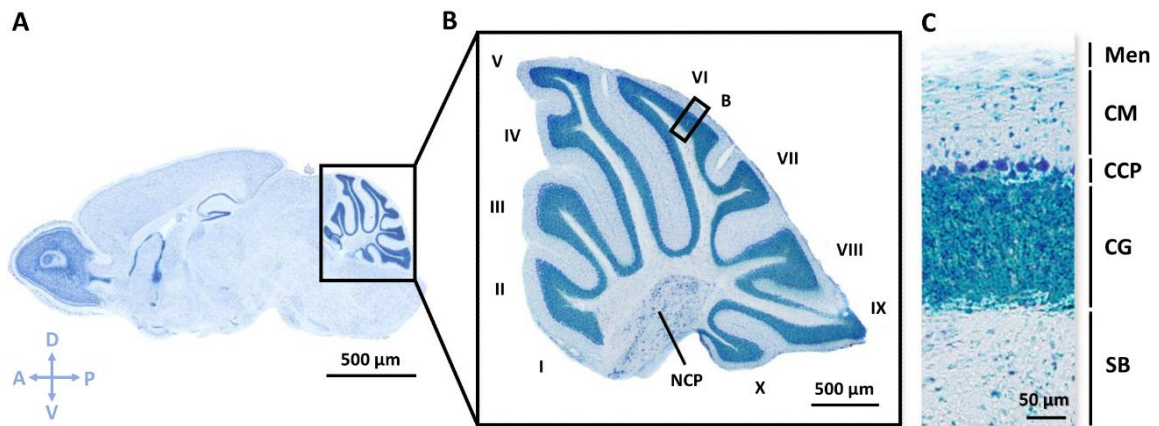


FIGURA 11. Citoarquitectura del cerebelo de un ratón adulto. (A) Sección sagital del encéfalo de un ratón adulto donde se muestra que el cerebelo se localiza en la parte más dorso-caudal del encéfalo. (B) Amplificación de una sección sagital del vermis cerebeloso con sus diez lóbulos enumerados del I al X. En la parte más central se localizan los NCP rodeados de la sustancia blanca. (C) Microfotografía de la corteza cerebelosa de un ratón adulto donde se muestra su organización trilaminar característica compuesta por la CM, CCP y CG. A, anterior; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; CM, capa molecular; D, dorsal; Men, meninges; NCP, núcleos cerebelosos profundos; P, posterior; SB, sustancia blanca; V, ventral. Tinción azul de toluidina. Modificado de Pérez-Martín, 2022.

A un nivel histológico, desde la parte más externa a la parte más interna, se pueden diferenciar dos regiones, la corteza cerebelosa y la sustancia blanca, en la que se encuentran los núcleos cerebelosos profundos.

La corteza cerebelosa es una estructura trilaminar constituida por la capa molecular, la capa de las células de Purkinje y la capa de los granos (Fig. 11 y Fig. 12). La capa molecular es la más externa y presenta una gran densidad de fibras nerviosas (neuropilo) que proceden principalmente de capas cerebelosas más internas. También hay somas neuronales que pertenecen a las células estrelladas y en cesto (células que se encargan de la modulación de las células de Purkinje; Fig. 12). Por debajo de la capa molecular se encuentra la capa de las células de Purkinje, que está formada por los somas de dichas neuronas dispuestos en forma de monocapa. Estas células extienden su árbol dendrítico hacia la capa molecular y envían su axón hacia la capa de los granos (Fig. 12; Lainé y Axelrad, 1994; Voogd y Glickstein, 1998; Amore et al., 2021; Osorno et al., 2022). Además de las células de Purkinje, en esa misma capa se pueden encontrar las células en candelabro (Lainé y Axelrad, 1994) y el soma de la glía de Bergmann (Voogd y Glickstein, 1998). Por último, por debajo de la capa de las células de Purkinje se sitúa la capa de los granos formada por los granos cerebelosos y otros tipos de interneuronas como las células de Golgi, las células de Lugaro y las células unipolares en cepillo.

Introducción

Centrándonos en los granos cerebelosos, se trata de células que presentan unas dendritas cortas en forma de garra y unos axones largos que se dirigen hacia la capa molecular donde se bifurcan y forman las denominadas fibras paralelas (Fig. 12; Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007; Sathyanesan et al., 2019).

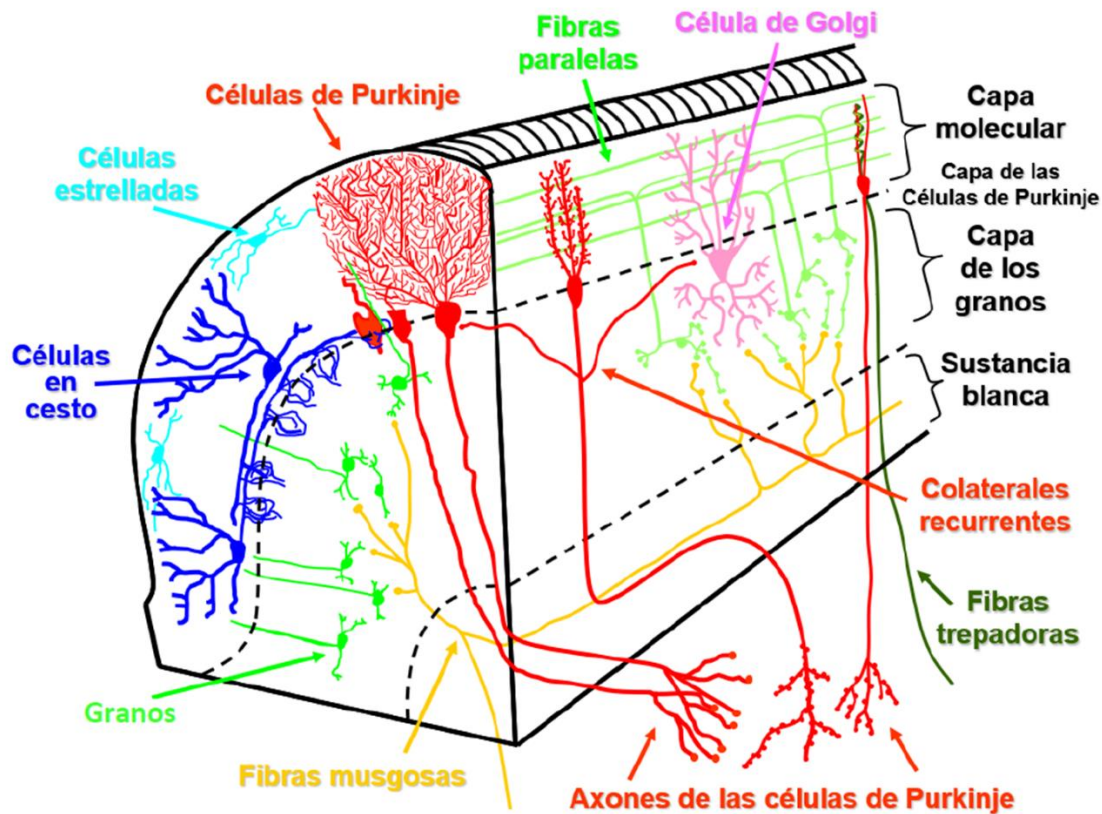


FIGURA 12. Estructura y composición de la corteza cerebelosa. La capa molecular es la más externa y está compuesta por las dendritas de las células de Purkinje, las células en cesto, las células estrelladas, las fibras paralelas y las fibras trepadoras. Contigua a esta capa, pero más hacia el interior se encuentra la capa de las células de Purkinje constituida por los somas de dichas células. Por último, más hacia el interior está la capa de los granos formada principalmente por los granos y otras interneuronas. Modificado de Recio, 2008.

Además, en la corteza cerebelosa también se encuentran las terminaciones de las dos vías aferentes principales del cerebelo: las fibras trepadoras (en la capa molecular) y las fibras musgosas (en la capa de los granos; Fig. 12; Sillitoe y Joyner, 2007). Por último, por debajo de la corteza cerebelosa se sitúa la sustancia blanca formada mayormente por neuropilo. Dentro de esta región se hallan los distintos núcleos cerebelosos profundos: fastigial, interpósito y dentado (Voogd y Glickstein, 1998).

Conexiones de los circuitos cerebelosos

En el cerebelo todas las aferencias se producen a través de los pedúnculos cerebelosos inferiores y todas las eferencias a través de los pedúnculos cerebelosos superiores (Schmidt y Bodznick, 1987; Voogd y Glickstein, 1998).

El circuito del cerebelo está principalmente integrado a través de las células de Purkinje que reciben información (aferencias) y envían información (eferencias) desde y a diferentes estructuras nerviosas (Fig. 13). Más específicamente, las células de Purkinje reciben sinapsis excitatorias principalmente desde dos vías aferentes. Por un lado, reciben información de las fibras musgosas que proceden de la médula espinal y del bulbo raquídeo, y que establecen sinapsis excitatorias con los granos. A su vez, los granos a través de sus fibras paralelas establecen sinapsis con las dendritas de un gran número de células de Purkinje en la capa molecular (Voogd y Glickstein, 1998; Sillitoe y Joyner, 2007). A través de esta vía, el cerebelo recibe tanto información sensorial periférica como de la corteza cerebral. Por otra parte, las fibras trepadoras procedentes del complejo olivar inferior se sitúan alrededor de las ramas de las dendritas de las células de Purkinje donde establecen gran cantidad de contactos sinápticos (Voogd y Glickstein, 1998). A través de esta vía, el cerebelo recibe información somatosensorial, visual y de la corteza cerebral. Además, cabe resaltar que tanto las fibras musgosas como las fibras trepadoras proyectan colaterales hacia los núcleos cerebelosos profundos (Sillitoe y Joyner, 2007).

La actividad de las células de Purkinje está inhibida por las células estrelladas, las células en cesto y las células de Golgi. Es decir, las células de Purkinje se encuentran siempre en el medio de todos estos circuitos. Una vez que las células de Purkinje integran toda esta información, la envían a través de sus axones hacia los núcleos cerebelosos profundos donde establecen sinapsis GABAérgicas inhibitorias (Sillitoe y Joyner, 2007). Por último, cada uno de los núcleos cerebelosos profundos envía sus proyecciones a regiones encefálicas específicas (Voogd y Glickstein, 1998).

Hay que destacar que las células de Purkinje son la única eferencia de la corteza cerebelosa. Asimismo, los núcleos cerebelosos profundos (que reciben la información de las células de Purkinje) constituyen la única eferencia cerebelosa (Fig. 13). Por tanto,

Introducción

un mal funcionamiento en las células de Purkinje produciría una disfunción cerebelosa muy marcada (Walter et al., 2006; Tara et al., 2018; Mayoral-Palarz et al., 2022).

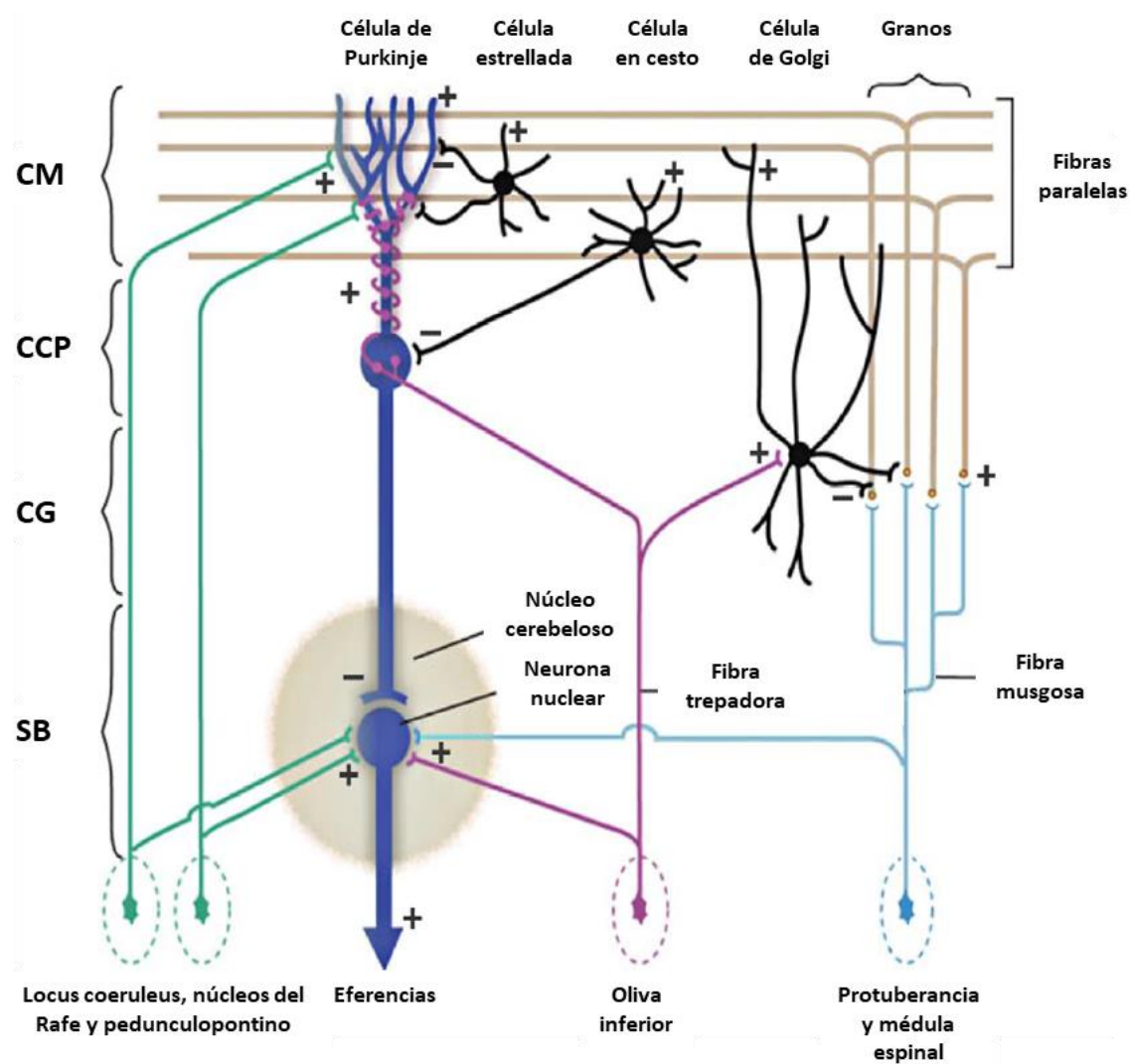


FIGURA 13. Representación gráfica de las conexiones cerebelosas. En este esquema se muestran las principales aferencias (fibras musgosas y trepadoras), eferencias, y cinco de los tipos neuronales involucrados en los circuitos cerebelosos. +, sinapsis excitadora; -, sinapsis inhibitoria; CM, capa molecular; CCP, capa de las células de Purkinje; CG, capa de los granos; SB, sustancia blanca. Modificado de Miall, 2013.

Por todo ello, el cerebelo se considera un centro de integración esencial de la información sensoriomotora para el control del movimiento, el mantenimiento de la postura y el aprendizaje motor (Ito, 2006; Sillitoe y Joyner, 2007; Manto et al., 2012; Popa y Ebner, 2019).

Pero no sólo participa en funciones motoras, sino que también se encuentra involucrado en el procesamiento de la información cognitiva, afectiva y social, y en los procesos de aprendizaje y memoria (Reeber et al., 2013; Vožeh, 2015; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Carta et al., 2019; Ernst et al., 2019; Jackman et al., 2020; Van der Heijden et al., 2021;

[Pérez-Martín et al., 2021](#)). De hecho, existen estudios *in vivo* donde se ha observado qué, en patologías cerebelosas, además de los síntomas motores típicos, existen alteraciones en el comportamiento cognitivo-afectivo, en la realización de funciones ejecutivas y en la memoria visoespacial. ([Stoodley y Schmahmann, 2010](#); [Muñoz-Castañeda et al., 2018](#); [Pérez-Martín et al., 2021](#)).

La microglía del cerebelo

La microglía del cerebelo presenta características únicas en comparación con la microglía de otras regiones encefálicas. Por ejemplo, en comparación con la cortical, la microglía del cerebelo se encuentra menos ramificada y distribuida por el tejido, pudiendo explorar menos parénquima nervioso ([Stowell et al., 2018](#)). Sin embargo, probablemente para suplir esa reducida capacidad exploratoria, la microglía cerebelosa presenta gran motilidad somática que le posibilita un desplazamiento muy rápido a través del parénquima nervioso para responder a las lesiones con prontitud ([Stowell et al., 2018](#); [Tan et al., 2020](#); [Stoessel et al., 2021](#)).

Además de ser diferente respecto a las otras regiones nerviosas, la propia microglía cerebelosa presenta cierta variabilidad dependiendo de la capa en la que se encuentre. Se ha observado que la microglía de la capa molecular se encuentra menos arborizada que la de la capa de los granos, y que en esta última hay una mayor densidad microglial ([Stowell et al., 2018](#); [Tan et al., 2020](#)). Asimismo, se ha observado que la motilidad de los procesos microgliales es mayor en la microglía de la capa de las células de Purkinje que en las capas molecular o de los granos ([Stoessel et al., 2021](#)).

Los distintos fenotipos morfológicos y dinámicos de la microglía cerebelosa podrían deberse al hecho de que estas células presentan una señalización de las vías relacionadas con procesos inmunitarios distinta en comparación con la microglía de otras regiones cerebrales como la corteza o la formación hipocampal ([Stoessel et al., 2021](#)). Específicamente, en investigaciones muy recientes, se ha demostrado que la microglía cerebelosa muestra una mayor riqueza de vías de señalización implicadas en la respuesta inmunitaria. Este hecho hace que la microglía del cerebelo presente un estado de inmunovigilancia mayor, siendo más sensible a cualquier variación o proceso patológico de su entorno ([Stowell et al., 2018](#); [Tan et al., 2020](#)).

Efectos de la mutación *pcd* en el cerebelo

Procesos neurodegenerativos

Durante los procesos de neurodegeneración cerebelosa del ratón PCD, se produce una rápida y muy marcada degeneración de las células de Purkinje. Sin embargo, no es el único tipo neuronal que degenera en esta estructura nerviosa.

La degeneración de las células de Purkinje comienza durante la tercera semana de vida postnatal (en torno a P18), afectando inicialmente a la zona medial del cerebelo (el vermis), con menos gravedad hacia las zonas más ventrales, y extendiéndose hacia los hemisferios (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007; Hernández-Pérez et al., 2023). La degeneración avanza rápidamente, de tal manera que a P25 aproximadamente han muerto más de la mitad de las células de Purkinje (Mullen et al., 1976; Wang y Morgan, 2007). A P30, la gran mayoría de las células de Purkinje ha desaparecido, pero se aprecia una clara supervivencia en la zona correspondiente al lóbulo X y a la parte más ventral del lóbulo IX, donde la muerte neuronal es más tardía que en el resto de los lóbulos cerebelosos (Hernández-Pérez, 2022). Finalmente, alrededor de P40 concluye la degeneración de las células de Purkinje, aunque aún puede permanecer alguna de estas neuronas en el lóbulo X (Mullen et al., 1976; Landis y Mullen, 1978; Alcalde, 2003; Hernández-Pérez et al., 2023). A pesar de que la neurodegeneración cerebelosa se hace claramente visible a partir de P18, las células de Purkinje de los ratones PCD presentan ciertas alteraciones ultraestructurales y morfológicas antes de que se produzca su muerte neuronal, ya en torno a P15. Esta etapa se conoce como etapa preneurodegenerativa y comprende el periodo acotado entre la aparición de dichas alteraciones (P15) hasta el comienzo de la muerte de las células de Purkinje de una forma evidente (P18; Baltanás et al., 2011; Muñoz-Castañeda et al., 2018). Si bien, hay que destacar que estudios recientes del laboratorio han encontrado evidencias de que estas señales preneurodegenerativas podrían ser incluso anteriores a P15 (Pérez-Revuelta, 2023).

La neurodegeneración de las células de Purkinje se produce por una serie de causas, generalmente asociadas a la ausencia de expresión del gen *Ccp1* y, por ende, de la proteína CCP1. En condiciones fisiológicas normales, las células de Purkinje presentan gran acumulación de ribosomas libres en su parte basal entre las edades comprendidas

entre P10 y P12. Esta agrupación comienza a desorganizarse a partir de P12 para asociarse a endomembranas, dando lugar a cisternas alineadas de retículo endoplasmático rugoso (Landis, 1973; Landis y Mullen, 1978). Por el contrario, los ratones PCD retienen la masa basal de polisomas hasta P15, haciendo que presenten menos cisternas de retículo endoplasmático rugoso (Landis y Mullen, 1978). Asimismo, se han observado prolongaciones de retículo endoplasmático rugoso que convergen en una cisterna central dilatada y carente de polisomas (Landis y Mullen, 1978). Esta configuración inusual del retículo endoplasmático rugoso es normal en las células de Purkinje inmaduras, pero cuando maduran pierden dicha conformación. Sin embargo, esto no sucede en los ratones PCD, que mantienen su retículo endoplasmático rugoso con una conformación inmadura hasta el momento de su neurodegeneración (Landis y Mullen, 1978). Más aún, en diversas investigaciones se ha observado que el estrés asociado a las alteraciones del retículo endoplasmático se encuentra implicado en el proceso neurodegenerativo de las células de Purkinje de los ratones PCD (Kyuhou et al., 2006; Baltanás et al., 2011). Más adelante, veremos que el mantenimiento prolongado de un fenotipo inmaduro se asocia a otras causas de la degeneración de las células de Purkinje de los ratones PCD.

Por otro lado, la mutación *pcd* induce daños en el DNA de las células de Purkinje, que induce un silenciamiento génico progresivo y una marcada heterocromatinización. Estos cambios son especialmente evidentes en el nucléolo, ya que sufre una alteración progresiva muy notable de los componentes fibrilar y granular (Baltanás et al., 2011). El cambio de conformación del nucléolo interviene en la síntesis de ribosomas y, por ello, en la maquinaria de síntesis de proteínas favoreciendo la inestabilidad de las células de Purkinje (Baltanás et al., 2011; Baltanás et al., 2019). Otro tipo de alteración que se produce en las células de Purkinje son los denominados nematosomas. Se trata de inclusiones citoplasmáticas formadas por filamentos muy gruesos de material fibrilar condensado sobre una matriz densa que aparecen en los somas de las células de Purkinje de los ratones PCD en torno a P18-P22 (Grillo, 1970; Landis y Mullen, 1978).

Por último, diversas investigaciones previas del laboratorio demuestran alteraciones morfológicas en las células de Purkinje de los animales PCD. Se ha observado que la ausencia de CCP1 afecta a la dinámica y flexibilidad de los microtúbulos contribuyendo a las alteraciones morfológicas de las células de Purkinje y a su progresiva degeneración

Introducción

en el cerebelo (Muñoz-Castañeda et al., 2018; Hernández-Pérez, 2022). Asimismo, se ha observado que los axones de las células de Purkinje presentan unos engrosamientos anómalos (denominados torpedos) relacionados con alteraciones en la transmisión sináptica (Baltanás et al., 2013). Por último, se han detectado alteraciones morfológicas en la dendrita primaria de las células de Purkinje durante el periodo preneurodegenerativo.

Se piensa que todas estas alteraciones morfológicas podrían influir en el comportamiento normal exploratorio y social de los ratones PCD (Muñoz-Castañeda et al., 2018; Pérez-Martín et al., 2022).

Como se ha comentado con anterioridad, en el cerebelo del PCD no solo degeneran las células de Purkinje, sino que también entre los 3-12 meses de edad, se produce una fuerte pérdida de gran cantidad de granos cerebelosos (Zhang et al., 1997; Triarhou, 1998; Muñoz-Castañeda et al., 2018). Se piensa que esta muerte es una consecuencia de la pérdida de apoyo trófico derivado de su diana sináptica, las células de Purkinje (Triarhou, 1998). Sin embargo, recientemente se ha observado que la muerte de los granos comienza a edades muy tempranas, en torno a P22 (Muñoz-Castañeda et al., 2018), por lo que resulta muy complicado determinar si esta muerte es o no secundaria a la de las células de Purkinje o si es debida a la propia mutación del gen *Ccp1*. Aparte de la pérdida de los granos, se produce la degeneración de algunas neuronas del complejo olivar inferior (origen de las fibras trepadoras) y de otras neuronas presentes en los núcleos cerebelosos profundos alrededor de los 10 meses de edad (Triarhou et al., 1987; Triarhou y Ghetti, 1991; Bäurle et al., 1997).

Toda esta degeneración neuronal repercute en la conformación histológica del cerebelo del ratón PCD. El cambio histológico más llamativo lo experimenta la capa molecular ya que sufre una reducción significativa de su espesor causada por la pérdida de las dendritas de las células de Purkinje y a la pérdida de las fibras paralelas de los granos (Mullen et al., 1976).

Procesos de neuroinflamación

En el cerebelo del ratón PCD, junto con los procesos neurodegenerativos, se desencadena una respuesta inflamatoria capitaneada principalmente por la microglía. Durante la degeneración de las células de Purkinje se produce una microgliosis muy

agresiva, rápida y exacerbada (Baltanás et al., 2013). Aunque una respuesta inflamatoria por parte de la microglía puede conferir neuroprotección a las regiones adyacentes a la zona dañada, una reacción microglial exacerbada, tal como ocurre en el cerebelo del ratón PCD, produce efectos neurotóxicos que incrementan los procesos neurodegenerativos (Milligan y Watkins, 2009).

En el cerebelo de los ratones silvestres la microglía se encuentra dispersa por todas sus capas, aunque preferentemente se localiza en la capa de los granos y en la sustancia blanca. Las células microgliales presentan un cuerpo celular pequeño y prolongaciones numerosas, finas y alargadas. En cambio, en los ratones PCD, la microglía prolifera y experimenta alteraciones morfológicas importantes a medida que progresa la degeneración de las células de Purkinje (Baltanás et al., 2013). A P15 comienzan a observarse cambios muy tenues, como un engrosamiento ligero de sus ramificaciones. A P20 ya se aprecia una marcada transformación estructural: los cuerpos celulares aumentan considerablemente de tamaño y las neuritas se acortan y se hacen más gruesas. Finalmente, a P25, las células microgliales alcanzan un grado de hipertrofia elevado, con menos ramificaciones y con una morfología más ameboide (Baltanás et al., 2013). Asimismo, ocurren cambios en la distribución microglial que se hacen evidentes a partir de P20. Específicamente, las células microgliales van delimitando la capa molecular y la capa de las células de Purkinje hasta que llegan a constituir casi una auténtica monocapa alrededor de las células de Purkinje, al fagocitar los restos de estas neuronas (Baltanás et al., 2013).

El bulbo olfativo

Características anatómicas y citoarquitectura

El BO es una de las principales estructuras nerviosas del sistema olfativo de los mamíferos. Se trata de una estructura par, paleocortical y ovoidal, que en los roedores ocupa la porción más rostral del encéfalo (Fig. 14; Díaz et al., 2013; Pérez-Boyero et al., 2023). El BO está formado principalmente por tres elementos neuronales: fibras de entrada, células de proyección e interneuronas locales. Estos elementos neuronales están distribuidos en siete capas laminares concéntricas, formadas por diferentes

Introducción

cuerpos celulares bien definidos, con determinadas características anatómicas y unos patrones sinápticos particulares (Fig. 14; Shipley et al., 2004; Nagayama et al., 2014; Del Pilar et al., 2021). Comenzando desde la superficie del BO y avanzando hacia el interior, las diferentes capas se denominan: capa del nervio olfativo, capa de los glomérulos olfativos, capa plexiforme externa, capa de las células mitrales, capa plexiforme interna, capa de los granos y sustancia blanca periependimaria (Pinching y Powell, 1971; Nagayama et al., 2014; Imamura et al., 2020).

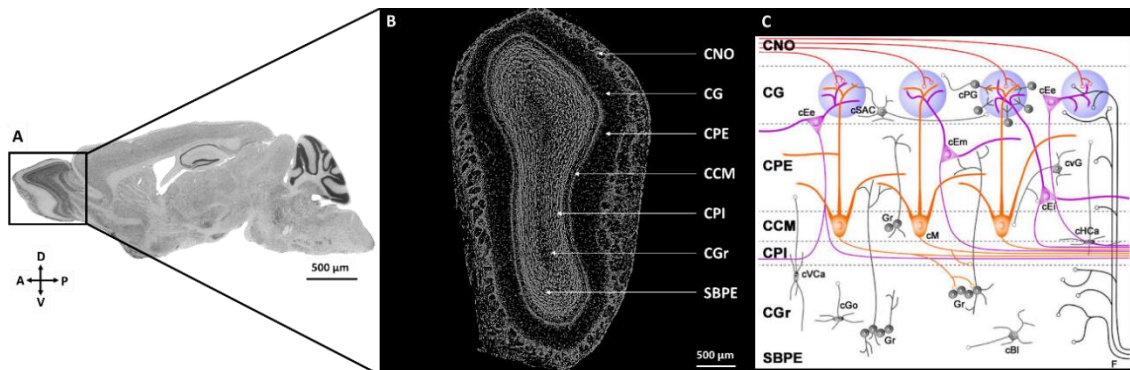


FIGURA 14. Citoarquitectura y conectividad del bulbo olfativo de un ratón adulto. (A) Sección sagital de un encéfalo de ratón adulto donde se puede observar que el BO se localiza en la parte más rostral del encéfalo. (B) Amplificación de una sección coronal de BO donde se observa claramente la organización laminar de sus diferentes capas. (C) Representación esquemática de la estructura laminar del BO y de sus principales tipos celulares. Tinción azul de toluidina. A, anterior; cBl, célula de Blanes; CCM, capa de las células mitrales; cEe, célula empenachada externa; cEi, célula empenachada interna; cEm, célula empenachada media; CG, capa glomerular; cGo, célula de Golgi; CGr, capa de los granos; cHCa, célula horizontal de Cajal; cM, célula mitral; CNO, capa del nervio olfativo; CPE, capa plexiforme externa; CPI, capa plexiforme interna; cPG, célula periglomerular; cSAC, célula superficial de axón corto; cVCa, célula vertical de Cajal; cvG, célula de van Gehuchten; D, dorsal; F, fibras aferentes procedentes de centros superiores; Gr, grano; P, posterior; SBPE, sustancia blanca periependimaria; V, ventral. Modificado de Shipley et al., 2004 y de Del Pilar et al., 2021.

La capa del nervio olfativo contiene los axones amielínicos procedentes de las neuronas receptoras olfativas. Dichos axones están rodeados por un tipo de células gliales denominadas células de la glía envolvente que posibilitan tanto el crecimiento de éstos como la guía para el establecimiento de nuevas conexiones neuronales (Pinching y Powell, 1971; Valverde, 2003).

Por debajo de la capa del nervio olfativo se encuentra la capa de los glomérulos. Esta capa está formada por unas estructuras nerviosas esferoidales denominadas glomérulos, muy ricas en neuropilo. Cada glomérulo olfativo se encuentra rodeado de una especie de cápsula formada por células gliales y somas de las células neuronales

yuxtglomerulares denominada región periglomerular (Shiple et al., 2004). Existen tres tipos de células yuxtglomerulares denominadas células periglomerulares, células superficiales de axón corto y células empenachadas externas. A su vez, estos tres tipos neuronales se pueden clasificar en dos grandes categorías: interneuronas (células periglomerulares y células superficiales de axón corto) y neuronas de proyección (células empenachadas externas; Shiple et al., 2004). El neuropilo del centro de los glomérulos está formado por las terminaciones de los axones del nervio olfativo, por las dendritas de las células mitrales y empenachadas medias e internas (que contactan con los anteriores) y por las terminaciones nerviosas de las células yuxtglomerulares (Díaz et al., 2013).

A continuación, situada entre la capa glomerular y la capa de las células mitrales está la capa plexiforme externa, que se caracteriza por la presencia de un denso neuropilo formado principalmente por las dendritas de las células mitrales, las dendritas y somas de las células empenachadas (medias e internas), las dendritas de los granos y los somas de unas interneuronas conocidas como células de van Gehuchten (Kosaka et al., 1994; Crespo et al., 2006).

Por debajo de la capa plexiforme externa se encuentra la capa de las células mitrales, constituida por los somas de las células mitrales dispuestos en forma de monocapa (Shepherd, 1972). Junto a las células mitrales se sitúan las células empenachadas internas. Ambos tipos celulares se encargan de procesar la información olfativa procedente de las neuronas receptoras sensoriales de la mucosa olfativa y de transmitir dicha información hacia otros centros encefálicos superiores (Halász, 1990). Asimismo, en la capa de las células mitrales también se pueden encontrar granos que desplazados desde su capa de origen (Shiple et al., 2004).

Seguidamente, por debajo de la capa de las células mitrales, se encuentra la capa plexiforme interna. Se trata de una capa muy delgada compuesta principalmente por los axones de las células de proyección (células mitrales y células empenachadas), dendritas de los granos, axones procedentes de centros superiores, somas de granos desplazados y alguna célula profunda de axón corto (Shiple et al., 2004; Crespo et al., 2006).

Por debajo de la capa plexiforme interna se encuentra la capa de los granos. Se trata de la capa más extensa del BO y en ella podemos encontrar dos tipos de células diferentes: los granos y las células profundas de axón corto. Los granos o células granulares son

Introducción

pequeñas interneuronas redondeadas que constituyen el tipo celular más abundante del BO. Es frecuente encontrar alguna de estas interneuronas de forma aislada invadiendo capas adyacentes (capa de las células mitrales, capa plexiforme interna o sustancia blanca periependimaria), y cuando eso sucede, reciben el nombre de granos desplazados. Por otro lado, están las células profundas de axón corto que son un tipo de interneurona. Siguiendo criterios morfológicos y de localización, se han diferenciado hasta cuatro tipos de células profundas de axón corto: células verticales de Cajal, células de Golgi, células de Blanes y células horizontales. Además de en esta capa, las células profundas de axón corto también pueden encontrarse en la capa plexiforme interna y en la capa de las células mitrales, aunque en menor medida (Pinching y Powell, 1971; Schneider y Macrides, 1978; Kosaka et al., 1994; Crespo et al., 2006).

Por último, en la parte más interna del BO se localiza la sustancia blanca periependimaria. Por su interior transcurren la mayoría de las fibras aferentes y eferentes del BO que convergen en la zona más caudal del mismo y forman el denominado tracto olfativo lateral (Price y Sprich, 1975; Lois et al. 1996; Doetsch et al., 1997; Recio et al., 2007). Además, en esta región se puede encontrar el extremo más rostral de la corriente migratoria rostral y los vestigios del ventrículo olfativo embrionario (Lois et al. 1996; Doetsch et al. 1997).

Conexiones de los circuitos olfativos

El BO es la primera estación del procesamiento de la señal olfativa. Por tanto, no es de extrañar que todos los elementos celulares que lo constituyen conformen una serie de circuitos neuronales de gran complejidad (Greer y Halász, 1987). Así, en el proceso de la percepción olfativa, los odorantes estimulan las neuronas receptoras olfativas del epitelio olfativo (Oberland et al., 2014). Los axones amielínicos de estas neuronas envían la información sensorial por el nervio olfativo hacia el BO, donde se ramifican en el interior de los glomérulos olfativos. Dentro de los glomérulos, los axones procedentes de las neuronas receptoras olfativas establecen sinapsis glutamatérgicas con las dendritas de las neuronas yuxtglomerulares (células periglomerulares, células superficiales de axón corto y células empenachadas externas), así como con las dendritas apicales de las células mitrales y células empenachadas medias e internas (células de proyección; Pinching y Powell, 1971). De este modo, la señal olfativa se

transmite desde las neuronas receptoras olfativas hasta las células de proyección, pero con un primer nivel de modulación. Pero además de en la capa glomerular, en la capa plexiforme externa y en la capa de los granos también existe una modulación de la transmisión de la señal olfativa. Una vez que ésta se ha procesado correctamente, viaja a través de los fascículos de axones procedentes de las neuronas de proyección (células mitrales y células empenachadas) que se dirigen hacia centros olfativos superiores como la corteza olfativa, la amígdala o el hipocampo, entre otros (Fig. 15; Soudry et al., 2011).

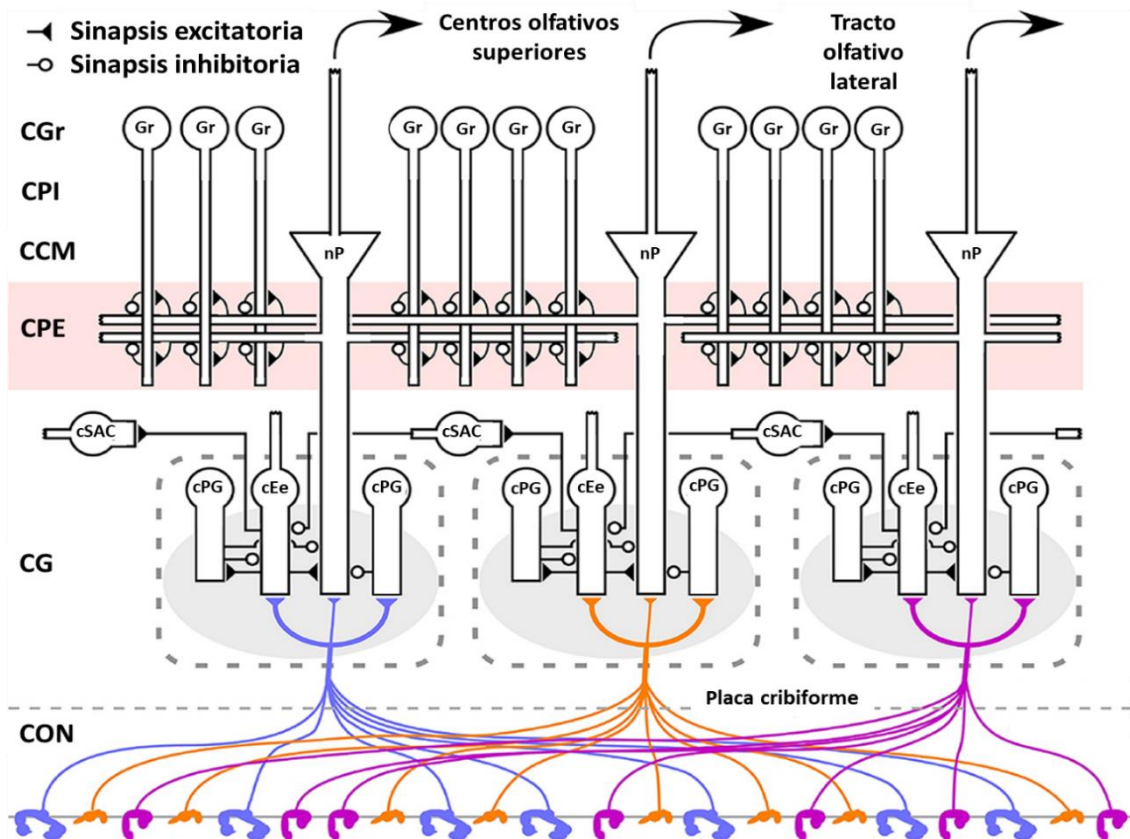


FIGURA 15. Conexiones existentes en el BO de un ratón. Los axones de las neuronas sensoriales olfativas que expresan el mismo receptor para un determinado odorante convergen al entrar en el BO y se arborizan formando los denominados glomérulos olfativos. Allí, las células empenachadas externas y las células periglomerulares se encuentran inervando cada glomérulo. A su vez, las células superficiales de axón corto se proyectan hacia la capa glomerular e interactúan con las células empenachadas externas. Por su parte, las neuronas de proyección (células mitrales y células empenachadas) interactúan a través de conexiones recíprocas en la capa plexiforme externa con las dendritas de los granos y además estas células envían la información olfativa hacia otras regiones encefálicas superiores. cEe, célula empenachada externa; CGI, capa glomerular; CON, capa del nervio olfativo; CPE, capa plexiforme externa; cPG, células periglomerulares; cSAC, célula superficial de axón corto; CCM, capa de células mitrales; CPI, capa plexiforme interna; CGr, capa de los granos; Gr, granos; nP; neuronas de proyección. Triángulos, sinapsis excitatorias; círculos abiertos, sinapsis inhibitorias. Modificado de Cleland, 2014 y Cleland y Borthakur, 2020.

Introducción

Para poder mantener esta red, existe un recambio constante de nuevas interneuronas, cuyos precursores viajan a través de la corriente migratoria rostral, desde la zona subventricular hacia las distintas capas del BO (Sakamoto et al., 2014). Asimismo, también se produce un recambio constante de los axones que proceden de nuevas neuronas receptoras olfativas situadas en el epitelio olfativo. Los contactos que establecen todas estas neuronas han de ser exquisitamente precisos y similares a los de las células que han sustituido para un adecuado funcionamiento del sistema olfativo. Además, este recambio no se produce de igual forma en las distintas etapas del individuo, ya que existe más proliferación e integración celular en los individuos más jóvenes que en los adultos. Más aun, el BO puede modificar diversos parámetros respecto al recambio celular y a sus conexiones en función de señales ambientales, condiciones sensoriales, señales moleculares y hormonales o tras sufrir un daño (Díaz et al., 2013; Eckmeier y Shea et al., 2014; Díaz et al., 2017; Pérez-Boyeró et al., 2023). Todo ello permite considerar a esta estructura nerviosa como una región de gran plasticidad, capaz de adaptarse a diversas situaciones y recuperar, mantener o ajustar una correcta fisiología.

La microglía del bulbo olfativo

Aunque la microglía ha sido ampliamente estudiada en muchas regiones encefálicas, se sabe muy poco sobre la que reside en el BO. Esta estructura nerviosa contiene una densidad de microglía mucho mayor que otras regiones encefálicas tales como el cerebelo o la corteza cerebral (Lawson et al., 1990; Tan et al., 2020). Además, diversos estudios demuestran que la microglía del BO en condiciones fisiológicas normales se encuentra altamente activa. Por tanto, la gran densidad microglial, así como su gran actividad podrían deberse a la implicación de la microglía tanto en los procesos de remodelación neuronal (no olvidemos que el BO es una región altamente plástica) como en el procesamiento de los diferentes olores por parte del BO (Lalancette-Hébert et al., 2009; Wallace et al., 2020).

Efectos de la mutación *pcd* en el bulbo olfativo

Procesos neurodegenerativos

Hasta aproximadamente los dos meses de edad, el BO de los ratones PCD muestra una organización histológica y sináptica normal (Greer y Shepherd, 1982). Sin embargo, aproximadamente en torno a P60 las células mitrales comienzan a degenerar de una forma moderadamente rápida hasta aproximadamente P90, periodo en el que mueren en torno al 75% de todas las células mitrales (Valero et al., 2006; Valero et al., 2007). El remanente se va perdiendo más lentamente entre P90 y P110, pero hay un cierto número de células mitrales que sobrevive, llegando a durar hasta incluso 8 meses (Greer y Shepherd, 1982; Greer y Halász, 1987; Baker y Greer, 1990; Valero et al., 2007; Díaz et al., 2012).

A pesar de la pérdida de las células mitrales, la actividad de los glomérulos del BO de los ratones PCD parece similar a la de los animales silvestres. Tampoco se han apreciado alteraciones en la distribución de los axones del nervio olfativo, de manera que las neuronas receptoras olfativas son capaces de responder a olores de forma normal (Greer y Shepherd, 1982). Esta integridad del epitelio olfativo en los animales PCD sugiere que las neuronas receptoras olfativas hacen sinapsis con las células de proyección supervivientes (células mitrales supervivientes y células empenachadas; Greer y Shepherd, 1982). Como consecuencia de este proceso degenerativo, varias poblaciones neuronales en el BO pierden sus conexiones sinápticas con las células mitrales: las células periglomerulares de la capa glomerular, las interneuronas de la capa plexiforme externa y los granos de su capa correspondiente. Por ello, paralelamente, se produce un proceso de reorganización sináptica por el que las células que se han quedado sin la inervación de las células mitrales establecen nuevos contactos sinápticos con las neuronas de proyección persistentes (Greer y Halász, 1987; Baker y Greer, 1990; Recio et al., 2007).

Al igual que ocurre con las células de Purkinje, las células mitrales de los ratones PCD sufren una serie de alteraciones ultraestructurales previas a su muerte. En ellas se han detectado diversas anomalías nucleares relacionadas con la acumulación de daños en el DNA. En concreto, se produce una heterocromatinización progresiva, que está asociada con una represión transcripcional y una reorganización de los compartimentos

Introducción

nucleolares. Esto ocasiona fallos en la biosíntesis de ribosomas y, por consiguiente, la desestructuración de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso (Valero et al., 2006). Todo ello desemboca en deficiencias a la hora de sintetizar nuevas proteínas. Como se puede observar, todas estas modificaciones citológicas son similares a las ya comentadas en las células de Purkinje de los ratones PCD (Landis y Mullen, 1978; Baltanás et al., 2011).

Con respecto a la histología general del BO del ratón PCD, se observan cambios relacionados con el tamaño de sus capas. Así, el tamaño de los glomérulos es menor en comparación con el de los animales silvestres. Esta reducción se debe a la pérdida de los penachos de las dendritas apicales de las células mitrales, que se extienden dentro de cada glomérulo (Greer y Shepherd, 1982). Además, la capa plexiforme externa experimenta un adelgazamiento considerable debido a la pérdida de las células mitrales que invadían con sus dendritas dicha capa (Halász et al., 1981). Por el contrario, la capa plexiforme interna parece aumentar en grosor debido a la desaparición de la capa de las células mitrales situada justo por debajo (Greer y Shepherd, 1982). Por último, la desaparición de los axones de las células mitrales produce una reducción muy marcada del tracto olfativo lateral, donde los axones remanentes son significativamente más delgados que los de los animales silvestres (Bartolomei y Greer, 1998; Recio et al., 2007).

Procesos de neuroinflamación

Al igual que en el cerebelo, durante los procesos neurodegenerativos que ocurren en el BO también se produce una respuesta inmunitaria desencadenada principalmente por las células de la microglía. Si bien, hay que resaltar que, en este caso, la microgliosis que se genera en el BO es más moderada, menos agresiva y más lenta en el tiempo que en el caso del cerebelo (Baltanás et al., 2013).

En el BO de un animal silvestre sano existe una alta densidad microglial con una morfología de aspecto muy ramificado y repartida uniformemente por todas las capas del BO. En el BO de los ratones PCD, la microglía al activarse cambia su morfología hacia una forma más ameboide acortando sus procesos, pero esta diferencia no es tan notable, y por tanto se considera que la hipertrofia de las células microgliales en el BO de los ratones PCD no es tan acusada ni tan frecuente como en el cerebelo. Asimismo, en el BO de los ratones PCD no existe una migración tan clara de la microglía hacia la

zona neurodegenerativa, es decir, hacia la capa de las células mitrales ([Baltanás et al., 2013](#)).

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Como se ha comentado en el apartado anterior, en la presente Tesis Doctoral se propone el uso del ratón PCD como modelo de inflamación ante una pérdida neuronal selectiva. Este animal presenta una degeneración posnatal de las células de Purkinje del cerebelo y de las células mitrales del BO debido a la ausencia de la expresión del gen *Ccp1*. Esta muerte neuronal produce dos contextos neuropatológicos distintos: de diferente intensidad, en ventanas temporales diferenciadas y localizados en regiones distales del encéfalo. Por tanto, el ratón PCD aúna en el mismo animal dos modelos de estudio de inflamación y, por ende, de microgliosis. Específicamente, en el cerebelo se produce una microgliosis exacerbada y rápida, mientras que en el BO se produce una microgliosis más moderada y espaciada en el tiempo. Hay que recordar que el gen *Ccp1* se expresa en células inmunitarias, como las microgliales, pero el efecto aislado de su mutación resulta prácticamente desconocido. Por todo ello, se puede considerar que el ratón PCD es un excelente modelo para analizar la respuesta microglial.

Por estas razones y tras la revisión bibliográfica realizada en el apartado [Introducción](#), se propone la siguiente hipótesis: **“la biología de la microglía está directamente relacionada con el daño neuronal que se produce en el ratón PCD”**.

Para dar respuesta a dicha hipótesis, se desarrollaron los siguientes objetivos:

1. Analizar *in vitro* el efecto de la expresión de *Ccp1* en el estado fisiológico de la microglía sin influencia neural directa. [Microglía derivada de la médula ósea](#).
2. Analizar *in vitro* el efecto de la expresión de *Ccp1* en el estado fisiológico de la microglía sin influencia directa de degeneración. [Microglía aislada de la corteza cerebral](#).
3. Analizar *in vitro* el efecto de la expresión de *Ccp1* en el estado patológico de la microglía bajo el ambiente neurodegenerativo del PCD. [Microglía aislada desde el cerebelo y desde el BO](#).
4. Analizar *in vivo* el efecto del ambiente neurodegenerativo del PCD sobre la biología de la microglía. [Estudio *in situ* de la microglía en el cerebelo y en el BO](#).
5. Analizar *in vivo* el efecto de la microglía sobre el proceso neurodegenerativo del ratón PCD. [Inhibidor de microglía PLX5622 en la neurodegeneración del cerebelo del PCD](#).

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales de experimentación

Se utilizaron ratones (*Mus musculus* L., 1758; Muridae, Rodentia, Mammalia) de la estirpe C57BL/DBA. Los ratones se obtuvieron cruzando las estirpes C57BL/6J y DBA/2J procedentes de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, EE. UU.). Los animales se criaron y mantuvieron en las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca a una temperatura y humedad relativa constantes y con un fotoperiodo artificial de 12/12 h. Todos los animales se alimentaron *ad libitum* con agua y pienso para roedores (Rodent toxicology diet, B&K Universal G.J., Molins de Rei, España). Los animales mutantes se suplementaron con agar gelatinizado al 3 % (p/v, Panreac, Castellar del Vallès, España) a partir de la edad de su destete (P21). Todos los animales se manipularon respetando la normativa vigente europea (Directiva 2010/63/UE y Recomendación 2007/526/CE) y española (RD118/2021 y Ley 32/2007), con la correspondiente aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Salamanca (referencia #00613).

Colonia PCD

Los animales empleados en la presente Tesis Doctoral pertenecen a la colonia híbrida PCD (C57BL/DBA) y portan la mutación original *pcd^{1J}* que se transfirió a la estirpe C57BL/6J en el año 1976 (Mullen et al., 1976; Landis y Mullen, 1978). Esta colonia se obtuvo al cruzar ratones macho heterocigotos para la mutación *pcd^{1J}* (*+/*pcd**) de la estirpe C57BL/6J con hembras homocigotas Wild Type (WT¹⁹; *+/+*) de la estirpe DBA/2J. Así se consiguió asociar el alelo mutante *pcd^{1J}* al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe C57BL/6J, mientras que el alelo silvestre quedó asociado al fondo genético del cromosoma 13 de la estirpe DBA/2J. El mantenimiento posterior de la colonia híbrida se realizó mediante cruces entre individuos heterocigotos debido a las características relacionadas con su fertilidad y cría que, con anterioridad, ya se han mencionado en el apartado de [Introducción](#).

Los ratones silvestres, los ratones heterocigotos y los ratones mutantes homocigotos (*pcd/pcd*) no pueden diferenciarse a edad temprana por su fenotipo (Landis y Mullen,

¹⁹ Del inglés *Wild Type*.

1978; Wang y Morgan, 2007). Asimismo, los animales silvestres y heterocigotos adultos tampoco se distinguen por su fenotipo (Landis y Mullen, 1978). Por ello, se empleó la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR²⁰) para identificar su genotipo. La mutación *pcd^{1J}* se encuentra en una región reguladora del gen *Ccp1* que, hasta ahora, no se ha identificado. Para la caracterización genotípica de la colonia PCD se amplificaron microsatélites del gen de interés, que son pequeñas secuencias de DNA compuestas por repeticiones en tándem de fragmentos de entre uno y seis oligonucleótidos. Estas secuencias de DNA son altamente polimórficas, por lo que se pueden utilizar como marcadores moleculares intraespecíficos. En nuestro caso, se escogieron dos microsatélites denominados D13Mit250 y D13Mit283 presentes tanto en la estirpe C57BL/6J como en la estirpe DBA/2J. Los microsatélites se localizan cerca del gen *Ccp1*, por lo que su transmisión se supone ligada con gran probabilidad. Además, entre las dos estirpes hay una diferencia lo suficientemente grande en el número de pares de bases (pb) de cada secuencia como para que se puedan distinguir al separarse mediante electroforesis en gel de agarosa (Fig. 16), como se describirá a continuación.

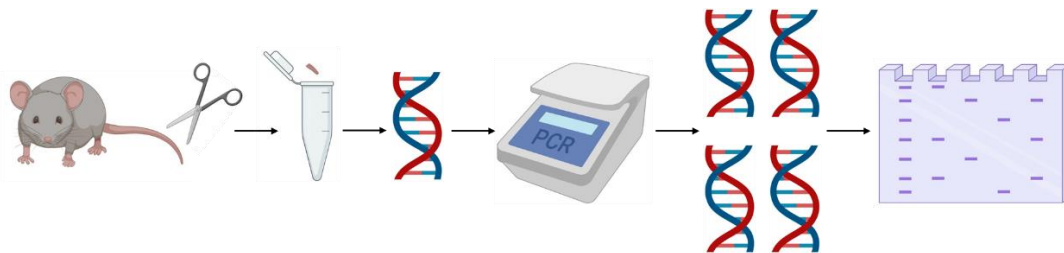


FIGURA 16. Proceso seguido para el genotipado de los ratones PCD. La extracción del DNA comienza con el corte de una pequeña muestra de la cola de los ratones. Una vez extraído el DNA se replica mediante la realización de una PCR. Por último, ya con la cantidad suficiente de DNA se realiza una electroforesis en gel donde se visualizan los diferentes fragmentos de DNA.

Genotipado de los animales

Extracción del DNA

Para la extracción del DNA se corta una pequeña muestra de la cola de los ratones a edades comprendidas entre P0-P12, lo que minimiza cualquier daño al animal. En ese mismo momento, los ratones se marcan individualmente con un rotulador permanente (ratones de P0-P5) o mediante perforación auricular (ratones mayores de P5). Cada

²⁰ Del inglés *Polymerase Chain Reaction*.

biopsia de la cola se introduce en un Eppendorf de 1,5 ml (VWR, Radnor, EE. UU.) al que se le añaden 430 µl de tampón de lisis (ver [Anexo I](#)). Seguidamente, los Eppendorf se introducen en un baño a 55 °C durante 2-3 h. Pasado este tiempo, cada Eppendorf se agita mediante un vórtex y se centrifuga durante 2 min a 16 G. El sobrenadante se pasa a otro Eppendorf nuevo al que se le añaden 430 µl de isopropanol (VWR), y de nuevo se agita y se centrifuga durante 10 min a 16 G. Posteriormente, el sobrenadante se desecha y al precipitado se le añaden 430 µl de etanol 70% (v/v; VWR), tras lo que se homogeneiza mediante un vórtex. El homogeneizado se vuelve a centrifugar durante 10 min a 16 G y nuevamente se desecha el sobrenadante. El precipitado final se deja secar durante 30 min para finalmente resuspenderlo en 20 µl de agua Elix.

Amplificación del DNA mediante PCR

Una vez el DNA extraído, mediante la técnica de la PCR se amplifican los microsatélites D13Mit250 y D13Mit283. Para ello, se utiliza un medio compuesto por tampón de reacción para la Taq Polimerasa 1X (Promega, Madison, EE. UU.), 0,125 U/µL de Taq polimerasa (Promega), desoxinucleótidos trifosfato 0,2 mM (dNTP; Promega), dimetilsulfóxido al 5% (v/v; DMSO; Sigma-Aldrich, San Luis, EE. UU.), MgCl₂ 1,5 mM (Sigma-Aldrich), la pareja de cebadores correspondientes; a 2,5 µM cada uno (ver [Tabla 1](#)) y 1 µL de muestra del DNA.

TABLA 1. Oligonucleótidos empleados para genotipar la colonia de los ratones PCD.

Secuencia D13Mit250		Secuencia D13Mit283	
Sentido	5'-ACACTCATTTCATGCACGA-3'	Sentido	5'-GGAAGCAGTCTCCTGCCTC-3'
Antisentido	3'-AGGTCCTCAAATCTCACAAGTAGG-5'	Antisentido	3'-GAGAGGTGGCACATGAGGTT-5'

Con el medio y los oligonucleótidos anteriores, se realiza la PCR usando el termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycle (Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) con el programa que se describe en la [Tabla 2](#).

TABLA 2. Condiciones de la PCR para el genotipado de los ratones PCD.

Ciclo	Fase	Temperatura		Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C		5 min
2	Desnaturalización	94 °C	x40	1 min
3	Alineamiento	54/53 °C		1 min
4	Elongación	72 °C		1 min 20 s
5	Elongación final	72 °C		10 min
6	Conservación	4 °C		∞

Electroforesis en gel de agarosa y visualización de las muestras

Una vez finalizada la PCR, los fragmentos de DNA se separan por electroforesis en gel de agarosa MS8 3% (p/v; Condalab, Madrid, España) en tampón Tris-borato ácido etilendiaminotetracético (Tris-borato EDTA; ver [Anexo 1](#)). Antes de que el gel solidifique, se añaden 5 µl del intercalante de DNA RedSafe™ (iNtRON, Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur) para visualizar los fragmentos con luz ultravioleta. El microsatélite D13Mit250 de la estirpe ligada al alelo mutante es de un tamaño mayor que el ligado al alelo silvestre, por lo que la banda correspondiente al genotipo *pcd* se desplazará menos distancia; con el microsatélite D13Mit283, más ligero en la estirpe ligada al alelo mutante, ocurre lo contrario ([Fig. 17](#)).

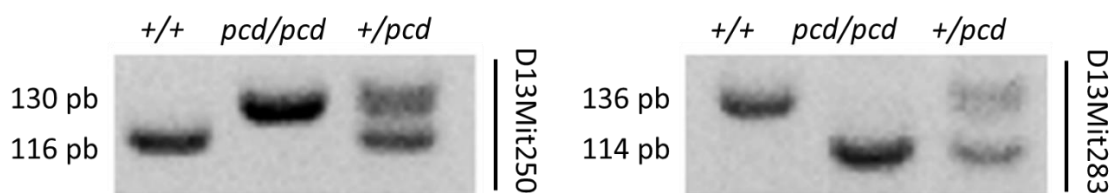


FIGURA 17. Resultado de la electroforesis para el genotipado de los ratones PCD. Como se puede observar en la figura, las bandas simples corresponden a animales WT (+/+) y PCD (*pcd/pcd*), y las bandas dobles a animales heterocigotos (+/*pcd*).

Diseño y tamaño muestral de los experimentos

El diseño de los experimentos que se han realizado en esta Tesis Doctoral se desarrolló bajo el principio de las 3 Rs de experimentación animal propuesto por [Russel y Burch, 1959](#) con el fin de utilizar el mínimo número de animales con el que se obtuvieran resultados robustos, concluyentes y reproducibles.

A continuación, se desglosa el reparto de los animales empleados para cada tipo de experimento y así dar respuesta a los objetivos principales de la presente Tesis Doctoral.

- **Para analizar *in vitro* el efecto de la expresión de *Ccp1* en el estado fisiológico de la microglía** se utilizaron 16 ratones WT y 16 ratones PCD de edad P25, y 16 ratones WT y 16 ratones PCD de edades comprendidas entre P2-P4. Los ratones P25 se utilizaron para estudiar el efecto de la mutación *Ccp1* sobre el funcionamiento de la microglía sin la influencia directa de un ambiente neural (microglía diferenciada a partir de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea). Por su parte, los ratones de edades P2-P4 también se emplearon para estudiar el efecto de la mutación *Ccp1* sobre la microglía, pero en este caso habiendo estado ya en contacto con un ambiente neural sano (microglía obtenida a partir de corteza cerebral de ratones neonatos).
- **Para analizar *in vitro* el efecto del ambiente neurodegenerativo del PCD sobre el estado fisiológico de la microglía** se utilizaron 16 ratones WT y 16 ratones PCD. La mitad de estos animales se emplearon para estudiar la microglía aislada directamente desde el cerebelo a la edad de P25, y la otra mitad se destinó para estudiar la microglía aislada directamente desde el BO a la edad de P70 (edades relacionadas con los procesos degenerativos de cada región, respectivamente).
- **Para analizar *in vivo* el efecto del ambiente neurodegenerativo del PCD sobre el estado fisiológico de la microglía** se utilizaron un total de 24 ratones WT y 24 ratones PCD a las edades de P15, P25 y P40 (antes, durante y después de la neurodegeneración de las células de Purkinje; 8 ratones a cada edad) para el estudio de la microglía del cerebelo; y un total 24 ratones WT y 24 ratones PCD a las edades de P40, P70 y P120 (antes, durante y después de la neurodegeneración de las células mitrales; 8 ratones a cada edad) para el estudio de la microglía del BO.

- **Para analizar *in vivo* la comunicación de la microglía con las neuronas durante los procesos neurodegenerativos del PCD** se utilizaron un total de 12 ratones WT y 12 ratones PCD a las edades de P15, P25 y P40 (antes, durante y después de la neurodegeneración de las células de Purkinje; 8 ratones a cada edad) para el estudio de la microglía del cerebelo; y un total 12 ratones WT y 12 ratones PCD a las edades de P40, P70 y P120 (antes, durante y después de la neurodegeneración de las células mitrales; 8 ratones a cada edad) para el estudio de la microglía del BO.
- **Para eliminar *in vivo* la microglía y observar sus efectos sobre los procesos neurodegenerativos del ratón PCD** se utilizaron 12 ratones WT y 18 ratones PCD a la edad de P25.

Para simplificar y hacer más comprensible esta memoria hemos clasificado los experimentos en estudios *in vitro* y estudios *in vivo*. Los primeros estarían destinados a conocer tanto a) la función del gen *Ccp1* como b) el efecto del ambiente neural (sano o enfermo) sobre el funcionamiento normal de la microglía. Los experimentos *in vivo* buscan analizar la microglía directamente en un contexto de neurodegeneración, para analizar las relaciones con las neuronas y para observar su papel en el desarrollo del proceso neurodegenerativo tras su inactivación farmacológica. A lo largo de este apartado se explicarán todos estos experimentos con más detalle ([Tabla 3](#)).

TABLA 3. Experimentos realizados para estudiar la microglía del ratón PCD tanto de forma *in vitro* como *in vivo*.

TIPOS DE EXPERIMENTOS					
IN VITRO			IN VIVO		
Microglía derivada de la médula ósea	Análisis por citometría	Analizar <i>in vitro</i> el efecto de la expresión de <i>Ccp1</i> en el estado fisiológico de la microglía (sin la influencia de un ambiente neural)	Microglía del cerebelo y BO	Análisis génico	Analizar <i>in vivo</i> el efecto del ambiente neurodegenerativo del PCD sobre el estado fisiológico de la microglía
	Análisis génico				
	Análisis inmunocitoquímico				
	Análisis fagocitosis			Análisis inmunohistoquímico	
	Análisis motilidad				
	Análisis proliferación				
Microglía aislada de la corteza	Análisis inmunocitoquímico	Analizar <i>in vitro</i> el efecto de la expresión de <i>Ccp1</i> en el estado fisiológico de la microglía (con la influencia de un ambiente neural)	Interacción microglía-neurona	Análisis génico	Analizar <i>in vivo</i> las interacciones microglía-neurona
	Análisis fagocitosis				
	Análisis motilidad				
	Análisis proliferación				
Microglía aislada del cerebelo y BO	Análisis inmunocitoquímico	Analizar <i>in vitro</i> el efecto del ambiente neurodegenerativo del PCD sobre el funcionamiento de la microglía	Administración del inhibidor microglial PLX5622	Pruebas de comportamiento motor	Eliminar <i>in vivo</i> la microglía y observar sus efectos sobre los procesos neurodegenerativos del ratón PCD
	Análisis fagocitosis			Análisis inmunohistológico	
	Análisis motilidad				

Experimentos *in vitro*

Se realizaron diferentes tipos de experimentos *in vitro* en células de microglía derivadas o aisladas de diferentes regiones y a diferentes edades. En concreto, se utilizaron:

- Microglía derivada de la médula ósea (BMDML²¹).** Para estudiar las células de BMDML, primero se caracterizaron por citometría de flujo, para continuar con análisis génicos, inmunocitoquímicos, de su capacidad fagocítica, de su motilidad y de su proliferación celular.

²¹ Del inglés *bone marrow-derived microglia-like*.

b) **Células de microglía aisladas desde la corteza cerebral de ratones neonatos.**

Con estas células se realizaron análisis génicos, inmunocitoquímicos, de capacidad fagocítica, de motilidad y de proliferación celular.

c) **Células de microglía aisladas desde el cerebelo y desde el BO.** Respecto a las células de microglía aisladas directamente desde los escenarios neurodegenerativos (cerebelo y BO) se realizaron análisis inmunocitoquímicos, de capacidad fagocítica y de motilidad. En este último caso, es conveniente resaltar que no se realizaron análisis génicos ni análisis de proliferación celular ya que se consideró más interesante realizarlos directamente en los escenarios *in vivo*, como se detallará en la sección correspondiente.

La metodología utilizada para cada una de estas pruebas experimentales se detallará a continuación. Primero se describirá la forma de obtener cada tipo de microglía (por diferenciación o por aislamiento celular), para después describir con detalle cada uno de los análisis realizados sobre dichas células.

Diferenciación / aislamiento de las células de microglía de las distintas regiones

Diferenciación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea hacia microglía derivada de la médula ósea

Para llevar a cabo la diferenciación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea hacia BMDML se siguió un protocolo modificado ([Servet-Delprat et al., 2002](#); [Hinze y Stolzing, 2011](#); [Hinze y Stolzing, 2012](#)). Para ello, las células madre hematopoyéticas de la médula ósea se extrajeron a partir de fémures, tibias e ilion de 8 animales WT y 8 PCD a P25, obteniéndose 4 cultivos WT y 4 cultivos PCD, ya que para cada cultivo fue necesario el uso de dos sujetos experimentales. Estos animales se sacrificaron por dislocación cervical y sus huesos se diseccionaron y trasladaron a una placa Petri (VWR) con solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco 1X (DPBS²²; Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE. UU.) 0,1 M, pH 7,4 a una temperatura de 4 °C. Las placas Petri

²² Del inglés *Phosphate Buffer Saline*.

junto con los huesos se colocaron en el interior de una campana de flujo laminar Heraguard ECO 1.5 (Thermo Fisher Scientific) en condiciones de esterilidad total. Para la extracción de las células de la médula ósea, las dos epífisis de cada hueso se perforaron con una jeringa de insulina (0,5 ml, 30 G x 0,3 x 8 mm; Becton Dickinson, Franklin Lakes, EE. UU.) y se inyectó medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM²³) bajo en glucosa (Sigma-Aldrich) a través de cada epífisis, lavando así la médula ósea. Las células de la médula ósea obtenidas junto con el medio DMEM bajo en glucosa se filtraron con un tamiz celular de 70 µm de diámetro de poro (Becton Dickinson) acoplado a un tubo Falcon de 50 ml (Corning, Nueva York, EE. UU.) y el filtrado que se obtuvo se centrifugó a 1.500 rpm. durante 5 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada MPW-352R (Biogen, Cambridge, EE. UU.). A continuación, se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 3 ml de solución de lisis de eritrocitos (ver apartado de [Anexo II](#)) durante 5 min a 4 °C sin agitación. La reacción de lisis finalizó al añadir DPBS 1X hasta un volumen de 50 ml. Llegados a este punto, se tomó una alícuota de 10 µl del volumen total y con el uso de una cámara Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania) se estimó el número total de células extraídas. Además, se empleó azul de tripán (Gibco, Waltham, EE. UU.) para determinar la viabilidad celular de las células extraídas. En ese mismo momento, las células resuspendidas en los 50 ml de DPBS se centrifugaron de nuevo a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM completo bajo en glucosa que contenía 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS²⁴) inactivado por calor (Hyclone cytiva, Logan, EE. UU.) y 1% (v/v) de la mezcla antibiótica penicilina-estreptomocina (Lonza, Pontevedra, España). Una vez resuspendidas, las células se sembraron en frascos de cultivo celular de 75 cm² con filtro (Thermo Fisher Scientific) y se mantuvieron en un incubador de CO₂ Steri-Cycle HEPA Class 100 (Thermo Fisher Scientific) a 37 °C y 5% (v/v) de CO₂ durante 24 h. Esto se hizo así para que las células que no fuesen de nuestro interés se adhirieran al plástico del frasco de cultivo ([Hinze y Stolzing, 2011](#); [Hinze y Stolzing, 2012](#)). Al día siguiente, el sobrenadante junto con nuestras células de interés (las que no se habían pegado al plástico y se encontraban en suspensión) se recogieron y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min a 37 °C. Seguidamente, se eliminó el sobrenadante y el pellet con las células se resuspendió en

²³ Del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

²⁴ Del inglés *Fetal Bovine Serum*.

Materiales y métodos

10 ml de Medio Acondicionado de Astrocitos (ACM²⁵; ver en Anexo II) que se obtuvo desde cultivos corticales de ratones neonatos WT, suplementado a su vez con el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos de ratón (GM-CSF²⁶, Sigma-Aldrich). El medio de cultivo junto con las células se añadió a un frasco de cultivo de 75 cm² con filtro y tratado previamente con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich; ver en Anexo II) para que las células pudieran adherirse a la base del frasco. El cultivo se mantuvo en un incubador a 37 °C y 5% (v/v) de CO₂ durante 10 días, tiempo necesario para que las células hematopoyéticas de la médula ósea se pudieran diferenciar a BMDML (Fig. 18). Pasado este tiempo, las células ya diferenciadas a BMDML se levantaron al añadir 5 ml de tripsina-EDTA 0,25% (v/v; Thermo Fisher Scientific). Para ello, se incubaron durante 5 min a 37 °C, tras los que se añadieron 10 ml de medio DMEM completo bajo en glucosa para parar la reacción enzimática. A continuación, toda la suspensión celular se recogió en un tubo Falcon de 50 ml y se tomó una alícuota de 10 µl para proceder al recuento total de las células con la ayuda de una cámara de Neubauer. Una vez hecho el conteo, la suspensión de células se centrifugó a 1.500 rpm durante 5 min a 37 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en un volumen variable de DMEM completo bajo en glucosa, dependiendo del experimento de destino de dichas células (ver más adelante para cada metodología específica).

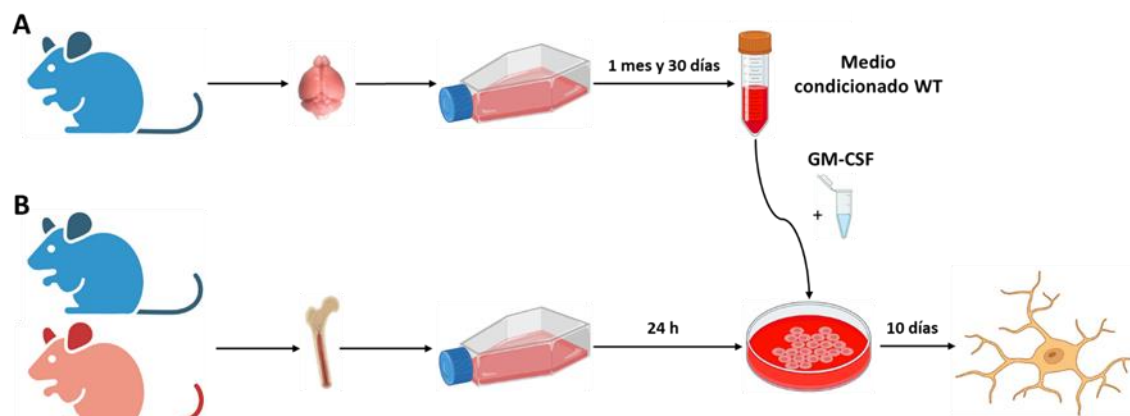


FIGURA 18. Cultivos realizados para la obtención de las células de BMDML. **(A)** Cultivo de corteza cerebral de ratones neonatales WT para la obtención de medio condicionado WT. **(B)** Cultivo de células hematopoyéticas de la médula ósea a las que se le añade el medio condicionado WT junto con el GM-CSF para así diferenciarlas a BMDML. Ratón azul, WT; ratón rojo, PCD.

²⁵ Del inglés *Astrocyte conditioned medium*.

²⁶ Del inglés *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*.

Aislamiento de la microglía desde la corteza cerebral

Para el aislamiento de la microglía desde la corteza cerebral se utilizaron 8 ratones WT y 8 PCD de edades comprendidas entre P2-P4 con los que se obtuvieron 4 cultivos WT y 4 cultivos PCD, ya que para cada cultivo fue necesario el uso de dos sujetos experimentales. Los ratones se sacrificaron por decapitación y sus cabezas se colocaron en una placa Petri con DPBS 1X, pH 7,4 a 4 °C para seguidamente trasladarse al interior de una campana de flujo laminar HeraGuard ECO 1.5 para trabajar en condiciones de máxima esterilidad. Una vez extraídas, las cortezas cerebrales se colocaron sobre una placa Petri con medio DMEM bajo en glucosa libre de suero a una temperatura de 4 °C donde se trocearon de forma mecánica con un bisturí (Swann-Morton, Hillsborough, Reino Unido). Una vez disgregadas, las cortezas se trasladaron a un Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 500 G durante 2 min a 37 °C en una centrífuga universal refrigerada MPW-352R. Seguidamente, el sobrenadante se eliminó y se añadió medio DMEM/F-12 (Thermo Fisher Scientific) que contenía una solución enzimática (Solución B; ver en [Anexo II](#)) compuesta por DNasa I (Sigma-Aldrich), tripsina (Sigma-Aldrich) y albúmina de suero bovino (BSA²⁷; Sigma-Aldrich) durante 20 min a 37 °C en agitación en un Agitador Incubador Orbital Compacto "222DS" (Biogen) para conseguir la mayor disgregación posible del tejido. Transcurrido este tiempo, la reacción enzimática se paró añadiendo medio DMEM/F-12 completo. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 500 G a 37 °C durante 5 min, se retiró el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 50 ml de medio DMEM/F-12 con DNasa y BSA (Solución A; ver en [Anexo II](#)), para finalmente filtrar todo a través de un tamiz celular de 40 µm de diámetro de poro (Becton Dickinson) acoplado a un tubo Falcon de 50 ml. El filtrado obtenido se centrifugó a 500 G a 37 °C durante 5 min, y de nuevo se retiró el sobrenadante para resuspender las células en 10 ml de medio DMEM/F-12 completo. Los 10 ml de medio junto con las células se pasaron a un frasco de cultivo de 75 cm² que previamente había sido revestido con poli-L-lisina. Por último, el frasco de cultivo se introdujo en el incubador a 37 °C y 5 % (v/v) de CO₂ durante 48 h, tras las cuales se retiró el medio de cultivo viejo y se añadió medio nuevo. En este punto, el cultivo se volvió a introducir en el incubador a 37 °C y 5 % (v/v) de CO₂ durante 15 días. Durante este tiempo, la microglía proveniente de la corteza cerebral se

²⁷ Del inglés *Bovine Serum Albumin*.

Materiales y métodos

multiplicó, obteniéndose de cada cultivo un número de células de microglía aceptable (más de 1 millón de células) para realizar los diferentes experimentos. Trascurridos los 15 días, las células de microglía se levantaron del frasco de cultivo mediante agitación a 120 rpm durante 2 h en el Agitador-Incubador utilizado anteriormente (**Fig. 19**). Una vez despegadas las células, la suspensión se trasladó a un Falcon de 50 ml y se procedió al conteo de las células de microglía con una cámara de Neubauer. Por último, la mezcla se centrifugó, se eliminó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en un volumen determinado (dependiendo del experimento para el que fueran destinadas las células) de DMEM/F-12 completo.

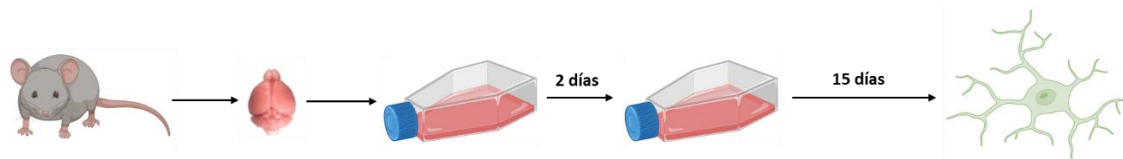


FIGURA 19. Cultivo de corteza cerebral de ratones neonatales WT y PCD para la obtención de microglía cortical WT y PCD.

Aislamiento de células microgliales desde cerebelo y bulbo olfativo

Para aislar la microglía del cerebelo y del BO se siguió un protocolo descrito previamente ([Lee & Tansey, 2013](#)) con ciertas modificaciones. Para ello, se utilizaron 8 ratones WT y 8 ratones PCD a P25 para el estudio de la microglía proveniente del cerebelo, y 8 ratones WT y 8 ratones PCD a P70 para el estudio de la microglía proveniente del BO. De cada dos ratones se obtuvo un cultivo celular, por lo que se consiguieron 4 cultivos WT y 4 cultivos PCD de células de microglía aisladas desde cada una de las dos regiones encefálicas.

Para su sacrificio, los ratones se anestesiaron intraperitonealmente con hidrato de cloral al 5 % (p/v; Sigma-Aldrich; 10 μ l/g de peso corporal) o con pentobarbital (Dolethal, 50 mg/kg de peso corporal) y se perfundieron con solución salina al 0,9% (p/v; Sigma-Aldrich). El efecto del anestésico se comprobó por la ausencia del reflejo palpebral, podal y de compresión de la cola. Una vez perfundidos, los cerebelos y los BO se aislaron y se colocaron sobre una placa Petri con medio DMEM/F-12 libre de suero. Una vez allí, el tejido se trituró de forma mecánica con ayuda de un bisturí y se transfirió junto con el medio de cultivo a un Falcon de 15 ml para después centrifugarse a 1.050 rpm durante

10 min en una centrifuga universal refrigerada MPW-352R. Después, el sobrenadante se retiró y al tejido troceado se le añadieron 10 ml de una solución enzimática formada por papaína, dispasa II y DNasa I (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 37 °C para conseguir una mayor disgregación del tejido. Pasado este tiempo la reacción se neutralizó añadiendo medio DMEM/F-12 completo compuesto por 10% (v/v) de FBS inactivado por calor y 1% (v/v) de mezcla antibiótica penicilina-estreptomicina. La mezcla se filtró en dos ocasiones por un tamiz celular de 40 µm de diámetro de poro acoplado a un tubo Falcon de 50 ml. Nuevamente, las células se centrifugaron a 1.050 rpm a 37 °C durante 10 min para posteriormente eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet en 2 ml de DMEM/F-12 libre de suero. Llegados a este punto, se tomó una alícuota de 10 µl de dicho volumen y con una cámara de Neubauer se estimó el número total de células de microglía extraídas tanto desde el cerebelo como desde el BO. Tras esto, la suspensión celular se centrifugó de nuevo a 1.050 rpm a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, las células se resuspendieron en 180 µl de DPBS 1X y, a continuación, a la mezcla se le añadía 10 µl de anticuerpo CD11b puro unido a microperlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Madrid, España) por cada 10^7 células de microglía. El anticuerpo CD11b marca específicamente la microglía, de manera que permitió aislar este tipo celular concreto. De este modo, tras una incubación de 45 min, la suspensión celular se lavó con DPBS y se hizo pasar por un sistema de columnas MACS (Miltenyi Biotec) para recoger las células microgliales específicamente unidas a los anticuerpos magnetizados. Posteriormente las células marcadas magnéticamente con el anticuerpo CD11b (marcador específico de la microglía) se recogieron utilizando el sistema de columnas MACS (Miltenyi Biotec). Por último, las células se añadieron a placas de 6 pocillos (VWR) para los experimentos de motilidad celular, o de 12 pocillos (VWR) para los experimentos de inmunocitoquímica o de fagocitosis celular, como se verá más adelante.

Batería de experimentos *in vitro* realizados en las células de microglía

La microglía con distintos orígenes descrita anteriormente se sometió a diferentes experimentos para analizar su biología. De este modo, se realizaron análisis de

citometría de flujo, génicos, inmunocitoquímicos, de la capacidad fagocítica, de la motilidad y de la proliferación celular.

Análisis con citometría de flujo

Los análisis con citometría de flujo solamente se realizaron en las células de BMDML. El objetivo de estos análisis fue comprobar con un primer cribado si la diferenciación de las células de la médula ósea hacia microglía se producía correctamente.

Para proceder a esta primera validación, las células se despegaron de los frascos de cultivo al añadir 5 ml de tripsina-EDTA 0,25 % (v/v) a cada frasco y se incubaron durante 5 min a 37 °C. Pasado este tiempo, se añadieron 10 ml de medio de cultivo DMEM completo bajo en glucosa para parar la reacción. A continuación, las células se trasladaron a un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 5 min a 4 °C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en DPBS 1X, pH 7,4 hasta un volumen de 10 ml. En este momento, se tomó una alícuota para estimar el número de células con la ayuda de una cámara Neubauer y con azul de tripano (VWR). Seguidamente, 10^6 células se resuspendieron en una solución de bloqueo de uniones inespecíficas compuesta por el anticuerpo anti-CD16/CD32 (**Tabla 4**) diluido en 50 μ l de DPBS 1X suplementado al 0,5% con FBS, y se dejaron en agitación a 4 °C durante 10 min. A continuación, se añadieron 50 μ l de solución de marcaje sobre la solución de bloqueo y las células se incubaron a 4 °C durante 30 min en oscuridad. La solución de marcaje estaba constituida por los anticuerpos correspondientes (**Tabla 4**) diluidos en DPBS 1X suplementado. Finalmente, se volvieron a centrifugar las células, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con DPBS suplementado y se llevó al Servicio de Citometría de Salamanca (Nucleus USAL), donde las células se midieron con un citómetro analizador en un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson). Para analizar las poblaciones microgliales se utilizaron los siguientes anticuerpos conjugados a sus respectivos fluoróforos: CD11b~PerCP-Cy5.5, CD45~APC, Iba1~APC, Tmem119~PerCP-Cy5.5 (**Tabla 4**).

TABLA 4. Anticuerpos empleados para la caracterización de las células de BMDML y el análisis de las posibles poblaciones microgliales derivadas. Se detallan los fluoróforos a los que están conjugados. APC, allophycocyanin; Cy, cyanine; PerCP, peridinin-chlorophyll-protein complex.

Anticuerpo - fluoróforo	Especie	Diana	Casa comercial	Dilución
CD11b~PerCP-Cy5.5	Rata	BMDML	BD Biosciences	4 µg/ml
CD16/CD32-sin fluoróforo	Rata	Receptores Fc de la BMDML	BD Biosciences	10 µg/ml
CD45-APC	Rata	BMDML	BD Biosciences	4 µg/ml
Iba1-APC	Ratón	BMDML	Thermo Fisher	4 µg/ml
Tmem119~PerCP-Cy5.5	Conejo	BMDML	Abcam	4 µg/ml

Análisis de la expresión génica

Para analizar la expresión génica de los distintos marcadores microgliales o los relacionados con algunas de las principales funciones de la microglía se utilizó la técnica de la PCR cuantitativa (qPCR²⁸). Para ello, se extrajo el RNA total de las células mediante el kit comercial PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, este RNA se utilizó como molde para la retrotranscripción a DNA copia (cDNA). Finalmente, con el cDNA se realizó la qPCR. Todo este proceso se explicará con detalle a continuación.

Extracción del RNA de las células

Para estudiar la expresión génica de las células de microglía, se utilizaron por una parte 8 ratones WT y 8 ratones PCD con los que se desarrollaron 4 cultivos de células BMDML WT y 4 cultivos de células de BMDML PCD (**Fig. 20**).

²⁸ Del inglés *quantitative polymerase chain reaction*.

Materiales y métodos

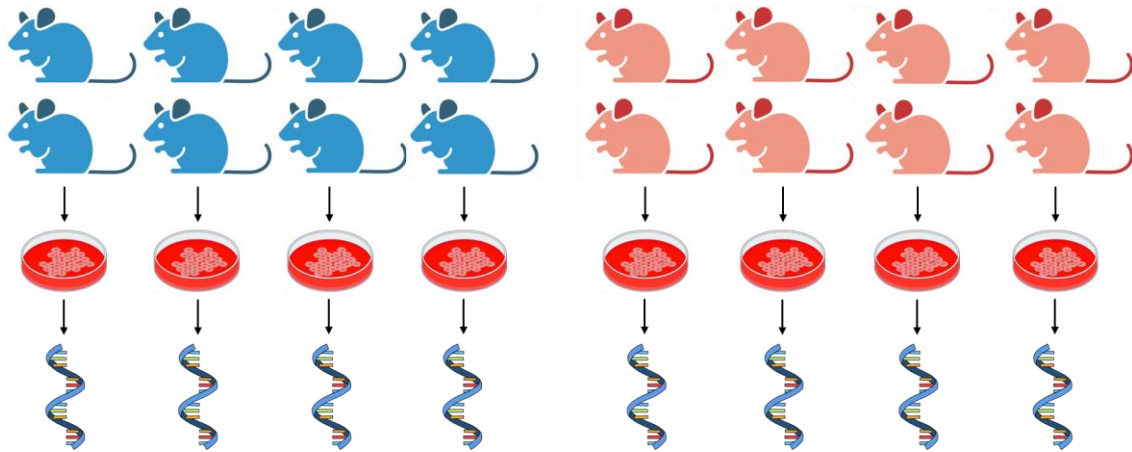


FIGURA 20. Número de animales utilizados para el análisis genético de la BMDML de tipo WT y PCD. Ratón azul, WT; Ratón rojo, PCD.

Para que la extracción del RNA fuera exitosa, se necesitó una densidad celular de 100.000 células/cm². Las células se homogeneizaron en 600 µl de tampón de lisis con β-mercaptoetanol 1:100 (v/v) con ayuda del homogeneizador Ultra Turrax T-10 basic (I.C.T., Madrid, España). El homogeneizado se centrifugó durante 2 min a 12 G, se tomó el sobrenadante y se desechó el precipitado. Al sobrenadante se le añadieron 600 µl de etanol 70% (v/v) y se mezcló con un vórtex. La nueva mezcla se añadió a la columna y se centrifugó durante 30 s a 12 G quedando así el RNA adherido a la columna, que actuaba como un filtro que posibilitaba desechar el medio sin el RNA. Después, el RNA se limpió de impurezas con 4 lavados de 2 tampones diferentes (2 lavados con Wash buffer I y 2 lavados con Wash buffer II); ambos proporcionados por el kit comercial PureLink™ RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific). Los tampones se añadieron a la columna para después proceder a su centrifugado, eliminando así los medios sobrantes. Después del lavado con el primer tampón, se utilizó el kit de DNasas PureLink™ DNase (Thermo Fisher Scientific) para eliminar los restos de DNA que se hubieran quedado unidos a la columna. Para este propósito, a cada columna se le añadieron 80 µl de un tampón compuesto por 8 µl de DNase Buffer 10X, 62 µl de agua libre de RNasas y 10 µl de DNasas, y esta mezcla se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la columna se limpió de las DNasas con un lavado con Wash buffer I. Después, se realizaron 2 lavados con Wash Buffer II y la columna se secó mediante una última centrifugación sin añadir nada. Por último, se añadieron 30 µl de agua libre de RNasas y se esperó durante 1 min antes de volver a centrifugar: el agua cambia de pH en la columna y provoca la separación del RNA de la misma, de modo que el RNA se disuelve en el agua y, al centrifugar, queda almacenado en un tubo de recolección

nuevo. Una vez ahí, se midió la concentración y la pureza del RNA extraído de cada una de las muestras usando un espectrofotómetro Nanophotometer IMPLLEN Pearl (IMPLEN, Múnich, Alemania). En el caso de haberse obtenido una concentración y un nivel de pureza de RNA adecuado, se procedió a la retrotranscripción.

Hemos de resaltar que todo el material que se utilizó para realizar la extracción del RNA se esterilizó y las RNasas se inactivaron por calor seco a 230 °C durante 2-3 h.

Retrotranscripción

Para este paso se utilizó el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Invitrogen) que contiene una polimerasa (retrotranscriptasa) capaz de polimerizar una cadena de cDNA a partir de un RNA monocatenario como molde. Para que la reacción fuese homogénea en todos los grupos de estudio, se usaron 300 ng de RNA en 10 µL por muestra (menor concentración obtenida de entre todas las muestras analizadas).

Siguiendo el protocolo del kit, para cada reacción se usaron 5,8 µl de un medio compuesto por: 2 µl de 10X RT Buffer, 0,8 µl de 25X dNTP Mix, 2 µl de 10X RT Random Primers y 1 µl de MultiScribe™ Reverse Transcriptase. A este medio se le añadieron 10 µl de cada muestra de RNA diluida en agua Milli-Q, de modo que hubiese 300 ng de RNA total. Las muestras se mezclaron con el vórtex, se centrifugaron y, posteriormente, se colocaron en el termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycle haciendo uso del programa que se indica en la [Tabla 5](#).

TABLA 5. Programa del termociclador para la realización de la retrotranscripción.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	25	37	85	4
Tiempo (min)	10	120	5	∞

PCR cuantitativa

El tipo de qPCR utilizada fue la qPCR relativa, con la que con el cDNA obtenido permite estudiar de forma indirecta la cantidad de RNA transcrito de los genes de estudio. Al ser relativa, se puede conocer si la expresión de un gen varía entre dos grupos: en nuestro caso, las células de BMDML de tipo PCD frente a las células de BMDML de tipo WT.

Materiales y métodos

Además, para que la cuantificación se ajuste, de forma más realista, los datos se normalizan con un gen de expresión constitutiva (*housekeeping*): en nuestro caso, el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*Gapdh*), cuya expresión en el ratón PCD no se encuentra alterada (Hernández-Pérez, 2022).

Los oligonucleótidos o cebadores para los genes analizados (Tabla 6) se tomaron de distintas fuentes bibliográficas o se diseñaron mediante la herramienta online “Universal ProbeLibrary Assay Design Center” de Roche (Hoffmann-La Roche, Basilea, Suiza). El diseño de los cebadores siempre se realizó cumpliendo con una serie de condiciones: cada cebador (*primer*) sería de un tamaño aproximado de 20 pb; la temperatura de fundido (*melting*) del amplicón tenía que estar alrededor de los 60 °C y, por último, el amplicón se debía encontrar entre dos exones.

Para comprobar que los oligonucleótidos que habíamos diseñado y los que habíamos seleccionado de otras publicaciones eran específicos para nuestros genes y no lo eran para otros, se utilizó la herramienta online *Ensembl genome browser* con la que para cada secuencia introducida se indicaba la especificidad de los oligonucleótidos diseñados para cada uno de los genes deseados.

TABLA 6. Secuencias de los *primers* utilizados en la técnica qPCR para el estudio de células *in vitro*.

Abreviaturas: *Ccl2*, chemokine (c-c motif) ligand 2; *Ccr2*, chemoattractant receptor 2; *Cd206*, cluster of differentiation 206; *Cd68*, cluster of differentiation 68; *Cx3cr1*, fractalkine/cx3c receptor 1; *Dap12*, dnax activator protein 12 kda; *Gapdh*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Iba1*, ionized calcium binding adaptor molecule 1; *Il-1 β* , interleukin 1 beta; *P2ry6*, pyrimidinergic receptor; *Tlr2*, toll-like receptor 2; *Tlr4*, toll-like receptor 4; *Tmem119*, transmembrane protein 119; *Tnf- α* , tumour necrosis factor α ; *Trem2*, triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

Gen	Oligo sentido 5' - 3'	Oligo antisentido 5' - 3'	Referencias
<i>Arg1</i>	GCAGCAGCCGCTGGAACCCAG	GTCCCCGTGGTCTCTCACGTC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Ccl2</i>	TGTTGGCTCAGCCAGATGCAGTTA	TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Ccr2</i>	CTCTGCAAACAGTGCCACAGTT	AACCGAGACCTCTTGCTCCCC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd206</i>	GGTTGGATTGAGGCCTGAAA	AACGTCCCTTTGTTTGAACATC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd68</i>	CTCATCATTGGCCTGGTCCT	GTTGATTGTCGTCTGCGGG	Doorn et al., 2015
<i>Cx3cr1</i>	TGTCCTTCTCTTTGTGAACATGA	GGCGGCGGCCATCTT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Gapdh</i>	GCCTATGTGGCCTCCAAGGA	GTGTTGGGTGCCCTAGTTG	Baltanás et al., 2013
<i>Iba1</i>	GCAGGAAGAGAGGCTGGAGGGGATC	CTTCTCAGCTCTAGGTGGGTCTTCGG	Rossi et al., 2018
<i>Il-18</i>	GGTGTGTGACGTTCCCATTA	CCGACAGCACGAGGCTTT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>P2ry6</i>	CCAGTGCCAGGTTCAAGGTGTA	GCGTCTACCGTGAGGATTCA	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Tlr2</i>	TGTCCGCAATCATAGTTTCTGATG	AGCAGAGAAGTGAAGCCCCT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Tlr4</i>	GGCTCCTGGCTAGGACTCTGA	TCTGATCCATGCATTGGTAGGT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Tmem119</i>	CCTTACCCAGAGCTGGTTC	GGCTACATCCTCCAGGAAGG	Kaiser y Feng et al., 2019
<i>Tnf-α</i>	GAAAAGCAAGCAGCCAACCA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Trem2</i>	GCACCTCCAGGAATCAAGAG	GGGTCCAGTGAGGATCTGAA	Yanguas-Casás et al., 2020

Materiales y métodos

Una vez el cDNA se había retrotranscrito, se utilizó SYBR Green (PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, Applied Biosystems, Foster City, EE. UU.) como agente intercalante del DNA para realizar la qPCR (ver más adelante). Siguiendo el protocolo, se utilizaron por pocillo 10 µL de SYBR Green Master Mix 2x (con dNTP, polimerasa y tampón correspondientes), los oligonucleótidos a una concentración final de 1 µM, cDNA molde y agua Milli-Q hasta completar 20 µl. Para todos los experimentos se utilizó el siguiente programa (**Tabla 7**):

TABLA 7. Programa para la realización de la qPCR.

	Paso 1	Paso 2	Paso 3	Paso 4
Temperatura (°C)	50	95	95	60
Tiempo (min)	2	10	0	15

El SYBR Green es una molécula intercalante de DNA con la particularidad de emitir una señal fluorescente sólo cuando está unida al DNA de doble cadena. A medida que transcurre cada ciclo de la qPCR, va aumentando la cantidad de DNA de doble cadena, lo que produce un aumento en el nivel de fluorescencia emitido por el SYBR Green. El termociclador QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (Applied BioSystems, Waltham, EE. UU.) es capaz de medir este nivel de fluorescencia al final de cada ciclo y representarlo en una gráfica. Esto origina una curva que sigue un patrón sigmoideo si la reacción ha transcurrido con normalidad: al principio apenas varía, pero después aumenta de forma exponencial para, finalmente, estabilizarse en una fase de meseta. En función de la fluorescencia que exista de fondo, el software del termociclador determina un nivel umbral o *threshold* 10 veces mayor que dicho fondo. Cuando la curva de fluorescencia se corta con dicho umbral, el ciclo en el que sucede se denomina ciclo umbral o Ct²⁹. Este valor es de gran importancia, puesto que todas las interpretaciones que se hagan de la expresión del gen estudiado serán en función a este número: cuando el Ct es un valor relativamente bajo, implica que hay más expresión del gen estudiado, puesto que la fase exponencial de la curva ha comenzado antes y el ciclo en el que se ha superado el umbral es más temprano; por otro lado, un Ct mayor implica que hay menos

²⁹ Del inglés *Cycle threshold*.

expresión del gen estudiado y la curva exponencial ha cruzado el umbral en un ciclo mucho más tardío.

Para cada uno de nuestros genes, se añadieron las muestras de cDNA por triplicado, los controles negativos y una recta patrón en placas de 96 pocillos de 0,2 µl de volumen. La recta patrón fue lo primero que se hizo antes de analizar las muestras, ya que se necesitaba conocer si los oligonucleóticos funcionaban adecuadamente. Una vez comprobada la eficiencia de los oligonucleótidos, se realizó la qPCR para todas las muestras y genes de interés.

Análisis de datos

Los valores Ct obtenidos se analizaron mediante “cuantificación relativa”, comparándose la expresión del gen de interés en las células PCD con relación a su expresión en las células WT, y normalizándolos respecto a la expresión de un gen constitutivo (*Gapdh*) para cada muestra. Con esto se obtiene un valor conocido como *Fold change* que representa cuánto cambia la cantidad de expresión génica de una muestra respecto a otra. Es decir, un *Fold change* de 1 entre dos muestras significaría que no hay diferencia de expresión entre ambas, pero un *Fold change* de 2 entre una muestra A respecto a B significa que hay el doble de expresión del gen en A con respecto a B. Para calcular el *Fold change* de las células PCD con relación a las células WT se aplicó la siguiente fórmula:

$$Fold\ change_{por\ región} = 2^{\left(\frac{(Ct\ resto\ de\ lóbulos - Ct\ lóbulo\ X)_{gen\ de\ interés}}{(Ct\ resto\ de\ lóbulos - Ct\ lóbulo\ X)_{gen\ constitutivo}}\right)}$$

Análisis inmunocitoquímico

Se empleó la técnica de la inmunocitoquímica indirecta para estudiar una serie de marcadores microgliales y observar su nivel de expresión, así como para analizar la morfología de las células de microglía.

Para ello, las células se sembraron en cristales de borosilicato de 18 mm Ø (VWR) tratados previamente con poli-L-lisina dentro de placas de 12 pocillos, a las que se añadió medio DMEM completo bajo en glucosa (en el caso de los cultivos de BMDML) o DMEM/F-12 completo (para la microglía aislada desde la corteza cerebral, desde el cerebelo o desde el BO). Posteriormente, las células se mantuvieron durante 24 h en un

Materiales y métodos

incubador a 37 °C y 5 % (v/v) de CO₂ para que se adhiriesen al cristal. Transcurrido este tiempo, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron con DPBS 1X a 37 °C para posteriormente añadir 500 ml de 4% paraformaldehído (Panreac, Madrid, España) durante 20 min a temperatura ambiente. Después, se realizaron 3 lavados con DPBS 1X y, por último, se añadió una solución de DPBS 1X con azida sódica al 5% (p/v; Panreac) para conservar la preparación hasta su análisis.

Para los distintos análisis inmunocitoquímicos realizados, se utilizaron anticuerpos contra los siguientes marcadores: Iba1, CX3CR1 y Tmem119 como marcadores generales de la microglía, y Ki67 como marcador de la proliferación celular (**Tabla 8**).

TABLA 8. Anticuerpos utilizados en los estudios inmunocitoquímicos para los análisis *in vitro*.

Anticuerpo	Concentración	Casa comercial
Iba1	1:500	Wako
CX3CR1	1:500	Abcam
Tmem119	1:500	Abcam
Ki67	1:500	Abcam

Análisis de la fagocitosis

Para estudiar la capacidad fagocítica de los distintos tipos de células de microglía las células se sembraron en medio DMEM bajo en glucosa sin suero (en el caso de las células de BMDML) o en DMEM/F-12 sin suero (para las células aisladas de la corteza cerebral, cerebelo y BO) en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de vidrio de 18 mm Ø recubiertos con poli-L-Lisina (50 µg/ml) a una densidad de 50.000 céls/mm. Tras 24 h de incubación en dicho medio, las células se lavaron dos veces con su correspondiente medio DMEM sin suero a 37 °C. Posteriormente, se añadieron al pocillo los reactivos de fagocitosis y el cultivo se introdujo durante 1 h en un incubador a 37 °C y 5 % (v/v) de CO₂. Dependiendo del tipo celular a analizar, se utilizó un tipo de reactivo de fagocitosis u otro: para el estudio de la fagocitosis de las células de BMDML y de la microglía aislada de la corteza cerebral se utilizaron microesferas fluorescentes Cy2 (0,5 µl/pocillo; Fluoresbrite YG Carboxylate Microspheres 1,00 µm, Polysciences, Warrington, UK). Para el estudio de la fagocitosis de la microglía aislada del cerebelo y del BO se utilizaron restos neuronales conjugados con Cy3 (relación 5:1; microglía:restos neuronales).

Pasado este tiempo, las células se lavaron con DPBS 1X a 37 °C para después fijarlas con paraformaldehído al 4%. Posteriormente, las células de microglía se marcaron con el anticuerpo anti-Iba1 de conejo (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japón; dilución 1:500) seguido de otra incubación con un anticuerpo secundario anti-conejo de cabra conjugado con Cy3 o Cy2 (1:1.000, según el color del fluorocromo utilizado en los reactivos de fagocitosis) durante 1 h y 30 min a temperatura ambiente. Por último, los cubreobjetos de vidrio se montaron en portaobjetos con un medio de montaje antidesvanecimiento constituido por 70% glicerol (v/v), 5% n-propil-galato (p/v), 0,42% glicina (v/v) y 0,03% azida (p/v; ver [Anexo I](#)).

Análisis de la motilidad celular

Para estudiar la motilidad de los distintos tipos de microglía, las células se sembraron a una densidad de 25.000 células/cm² en placas de 6 pocillos recubiertas con poli-L-lisina (10 µg/ml). Para analizar la motilidad, se adquirieron imágenes de contraste de fases de tres campos por pocillo, cada 2 min durante 2 h, con un objetivo 20X 0.70 DRY Leica DMI6000B del microscopio con función time-lapse (Leica AF 6500-7000, Madrid, España). La motilidad de la microglía se evaluó utilizando dos parámetros: el área total cubierta por las células durante la adquisición (expresada como el área en mm² cubierta por una sola célula durante un periodo de 2 h) y la deambulación de las células (desplazamiento, medido como el área en µm² que una célula se desplaza durante 1 min). Para ello, se desarrolló una macro con el programa FIJI (NIH, Wisconsin, EE. UU.) que automatizó todos los análisis, haciendo más fiable y uniforme el estudio.

Análisis de la proliferación celular

Para estudiar la proliferación celular se emplearon dos técnicas diferentes. La primera de ellas, como se comentó en el apartado anterior, fue la técnica de la inmunofluorescencia indirecta mediante el uso del marcador Ki67. La segunda estrategia se basó en el uso del compuesto químico denominado *AlamarBlue* (Bio-Rad, Berkeley, EE. UU.). Dicho compuesto es un colorante que incorpora un indicador de óxido-reducción que emite fluorescencia y cambia de color en respuesta a la reducción química del medio de cultivo resultante del crecimiento celular ([Al-Nasiry et al., 2007](#); [Rampersad, 2012](#); [Kumar et al., 2018](#); [Fig. 21](#)).

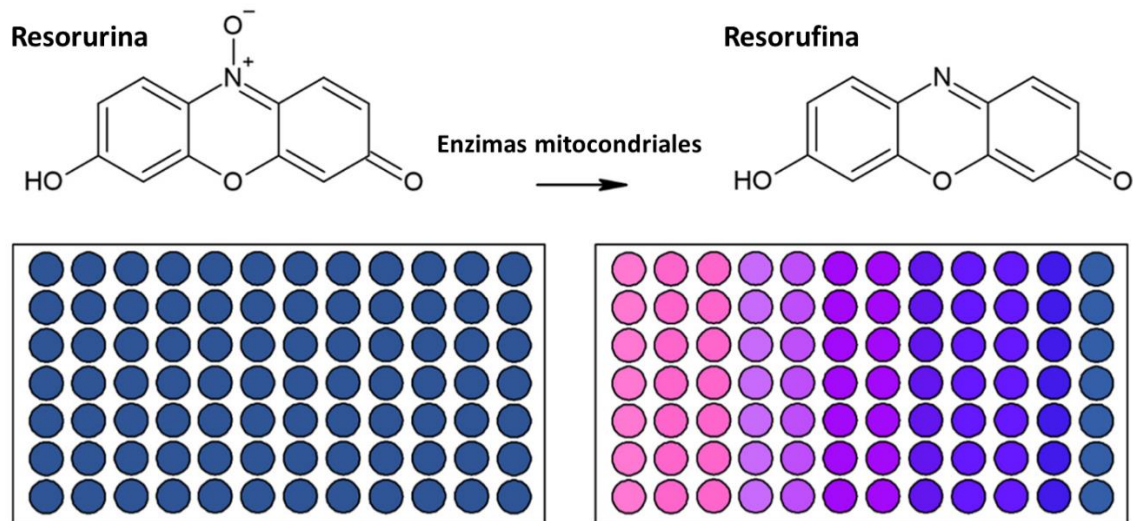


FIGURA 21. Prueba de proliferación con *AlamarBlue*. Este tipo de estudio de proliferación se basa en una reacción colorimétrica. Inicialmente, el compuesto presenta un color azul oscuro, que va cambiando hacia tonos rosáceos. Específicamente, cuanto más cambia el color hacia tonos rosáceos, más proliferación celular se produce.

Para este ensayo las células se sembraron en una placa de 24 pocillos (VWR) con medio DMEM completo bajo en glucosa (en el caso de las células de BMDML) o DMEM/F-12 completo (para las células de microglía aisladas de la corteza cerebral) durante 10 días. Se realizaron mediciones con el *AlamarBlue* en los días 1, 3, 6 y 9 desde el momento de la siembra de la microglía en su correspondiente pocillo. Para cada una de las mediciones a cada pocillo se añadían 900 μ l de medio DMEM completo bajo en glucosa o de medio DMEM/F-12 completo (según el tipo celular cultivado) junto con 100 μ l del *AlamarBlue* manteniéndose así durante 4 h en un incubador a 37 °C y 5 % (v/v) de CO₂ en oscuridad. Posteriormente, de cada pocillo se recogieron 100 μ l por duplicado y se añadieron a una placa de 96 pocillos (VWR) para finalmente proceder a la medición en un lector de microplacas (AMR-100, Bio-Rad) usando una longitud de onda de 470 nm. Hay que resaltar que, antes y después de añadir el *AlamarBlue*, se renovó el medio de cultivo para mantener las células en un estado óptimo tanto para su conservación como para la realización de la misma prueba.

Visualización al microscopio y análisis de las imágenes *in vitro*

Los diferentes tipos de microglía se observaron bajo diferentes tipos de microscopios, dependiendo del tipo de análisis. Para la inmunocitoquímica, las imágenes se tomaron

con un microscopio de epifluorescencia Olympus Provis AX70 (Olympus, Tokio, Japón) equipado con una cámara digital Olympus DP70 (12,5 MP, Olympus), y/o con un microscopio confocal STELLARIS 8 (Leica Microsystems, Madrid, España).

Para los análisis de fagocitosis se utilizó el microscopio confocal STELLARIS 8, ya que para el análisis de este tipo de imágenes fue necesario realizar una reconstrucción tridimensional a partir de planos focales (*Z-stack*), lo que permitió observar y distinguir el material ingerido (microesferas o restos neuronales) por las células de microglía.

Por su parte, para los estudios de la motilidad celular se utilizaron dos microscopios diferentes. Para el estudio de las células de BMDML y de las células de microglía aisladas de la corteza cerebral se utilizó un microscopio de célula viva Axio observer ZEISS (ZEISS, Oberkochen, Alemania). Por su parte, para las células de microglía aisladas del cerebelo y del BO de ratones adultos se utilizó un microscopio con función time-lapse Leica AF 6500-7000 (Leica).

Por último, para los estudios de proliferación se utilizó un microscopio de epifluorescencia Leica DMI3000 B (Leica) equipado con una cámara digital Leica DFC300 FX (1,4 MP, Leica).

Independientemente del microscopio utilizado para capturar las imágenes, éstas se procesaron y analizaron con los programas Adobe Photoshop CC 2020 (Adobe Inc., San José, EE. UU.) y FIJI. Específicamente, para el análisis tanto del área como de la intensidad de expresión de Iba1, en primer lugar, se identificó en cada imagen cada célula de forma aislada para segmentarla; de esta manera se pudo estimar el área celular. Posteriormente, se utilizó la herramienta "*Threshold*", para obtener el nivel de expresión de Iba1 (intensidad media). Por su parte, para los análisis de la fagocitosis celular se realizó el conteo del número de microesferas o del área ocupada por los restos neuronales, y este valor se refirió al área ocupada por cada célula de microglía. Por último, para el análisis de la motilidad se utilizaron secuencias de imágenes tomadas a diferentes tiempos. En cada una de ellas, se midió el área ocupada por cada célula. Tras ello, se calculó la diferencia del área ocupada por la microglía respecto a cada tiempo, obteniéndose así una estimación de su velocidad.

Análisis estadísticos de los experimentos *in vitro*

Todos los datos que se obtuvieron se representaron como la media \pm la desviación estándar (SD³⁰). Además, se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de los diferentes tipos de muestras con las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene.

Debido a la variedad de pruebas estadísticas empleadas, en cada apartado de resultados se indicará el análisis que fue utilizado. Para los datos que cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad ($p > 0,05$ para las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene) se utilizó la prueba paramétrica t de Student o análisis de la varianza (ANOVA). Por el contrario, cuando los datos no cumplieron el supuesto de normalidad y/o homocedasticidad ($p < 0,05$ para las pruebas de Shapiro-Wilk y/o Levene), se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis. Asimismo, el nivel mínimo de significación estadística se estableció en $p < 0,05$, estableciéndose como altamente significativo cuando $p < 0,01$. Todos los gráficos y los análisis estadísticos se realizaron con los programas SPSS versión 26 para Windows (IBM, Armonk, EE. UU.) y GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows (GraphPad, San Diego, EE. UU.).

Experimentos *in vivo*

Caracterización de la microglía del cerebelo y del bulbo olfativo

Una vez caracterizada la microglía del PCD de forma *in vitro*, se quiso dar un paso más y caracterizarla *in vivo*, sobre los escenarios de neurodegeneración e inflamación tanto del cerebelo como del BO. Para ello, se estudió *in situ* la microglía del PCD mediante un análisis génico e inmunohistológico, como se detallará a continuación.

³⁰ Del inglés *Desviation Standar*.

Análisis génico

Extracción del RNA, retrotranscripción y qPCR

Al igual que en los experimentos *in vitro*, para analizar la expresión génica de los distintos marcadores microgliales o relacionados con algunas funciones microgliales típicas, se utilizó la técnica de qPCR. Para ello, el RNA total del cerebelo y del BO se extrajo mediante el kit comercial PureLink™ RNA Mini Kit, el RNA se utilizó como molde para retrotranscribirse a cDNA y, finalmente, con el cDNA se realizó la qPCR. Este procedimiento es muy similar al descrito para los experimentos *in vitro*, pero con pequeñas diferencias que se detallan a continuación.

Se utilizaron grupos experimentales de 4 ratones WT y 4 ratones PCD para cada edad de estudio, tanto en el cerebelo como en el BO. Para el cerebelo, las edades de estudio fueron P15, P25 y P40 (antes, durante y después de la muerte de las células de Purkinje); y para el BO fueron P40, P70 y P120 (antes, durante y después de la muerte de las células mitrales). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical seguida de decapitación. El cerebelo y el BO se diseccionaron bajo una lupa (Leica Biosystems, Nussloch, Alemania). Tanto el cerebelo como el BO se guardaron en tubos Eppendorf y se congelaron sumergiéndolos en nitrógeno líquido para almacenarse a -80 °C hasta su uso.

Para la extracción del RNA, el tejido se homogeneizó en 600 µl de tampón de lisis con β-mercaptoetanol 1:100 (v/v). El homogeneizado se pasó por una jeringuilla 30 G y se centrifugó 2 min a 12 G. Por último, se tomó el sobrenadante.

A partir de aquí, todo el proceso (extracción del RNA, retrotranscripción y qPCR) fue idéntico al seguido para la extracción del RNA de los estudios *in vitro*, explicado ya con anterioridad. Aunque esta vez se incluyeron algunos oligonucleótidos más en el estudio (**Tabla 9**).

Materiales y métodos

Gen	Oligo sentido 5' - 3'	Oligo antisentido 5' - 3'	Referencias
<i>Arg1</i>	GCAGCAGCCGCTGGAACCCAG	GTCCCCGTGGTCTCTCACGTC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Ccl2</i>	TGTTGGCTCAGCCAGATGCAGTTA	TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Ccr2</i>	CTCTGCAAACAGTGCCCAAGTT	AACCGAGACCTCTTGCTCCCC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd200r</i>	CATAGGATGCATTTGTCTTTTGAAA	GCTGCATTTATCCTCCTCAATA	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd206</i>	GGTTGGATTGAGGCCTGAAA	AACGTCCTTTGTTTTGAACATC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd68</i>	CTCATCATTGGCCTGGTCCT	GTTGATTGTCGTCTGCGGG	Doorn et al., 2015
<i>Cx3cr1</i>	TGTCCTTTCTTTGTGAACATGA	GGCGGCGGCCATCTT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Dap12</i>	CGTACAGGCCAGAGTGAC	CACCAAGTCACCCAGAACAA	Sumpter et al., 2011
<i>Gapdh</i>	GCCTATGTGGCCTCCAAGGA	GTGTTGGGTGCCCTAGTTG	Baltanás et al., 2013
<i>Iba1</i>	GCAGGAAGAGAGGCTGGAGGGGATC	CTCTCAGCTCTAGGTGGTCTTCGG	Rossi et al., 2018
<i>Il-1β</i>	GGTGTGTGACGTTCCATTA	CCGACAGCACGAGGCTTT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Inos</i>	CTTTGCCACGGACGAGAC	AACTCCAGTCATTGTA CTGAGG	
<i>P2ry6</i>	CCAGTGCCAGGTTCCAGGGTGTA	GCGTCTACCGTGAGGATTCA	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Tlr2</i>	TGTCCGAATCATAGTTTCTGATG	AGCAGAGAAGTGAAGCCCCT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Tlr4</i>	GGCTCCTGGCTAGGACTCTGA	TCTGATCCATGCATTGGTAGGT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Tmem119</i>	CCTCACCCAGAGCTGGTTC	GGCTACATCCTCCAGGAAGG	Kaiser y Feng, 2019
<i>Tnf-α</i>	GAAAAGCAAGCAGCCAACCA	CGGATCATGCTTTCTGTGCTC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Trem2</i>	GCACCTCCAGGAATCAAGAG	GGGTCCAGTGAGGATCTGAA	Yanguas-Casás et al., 2020

Análisis histológico

Obtención y preparación del tejido

Para los análisis histológicos las edades de sacrificio de los animales variaron en función de la región nerviosa estudiada. Para el análisis de la microglía del cerebelo los animales utilizados se sacrificaron a las edades de P15, P25 y P40; antes, durante y después de la neurodegeneración de las células de Purkinje del cerebelo. Por su parte, para el análisis de la microglía del BO, los animales se sacrificaron a las edades de P40, P70 y P120; antes, durante y después de la neurodegeneración de las células mitrales del BO.

Sacrificio y disección

Todos los sujetos experimentales destinados para los análisis histológicos se sacrificaron por exanguinación, previa anestesia mediante inyección intraperitoneal con 5% hidrato de cloral (p/v; Sigma-Aldrich; 10 µl/g de peso corporal). El efecto del anestésico se comprobó mediante la ausencia del reflejo palpebral, podal y de compresión de la cola. A continuación, se administraron 100 µl de heparina sódica (1.000 U/ml; Sigma-Aldrich) vía intraaórtica a través del ventrículo izquierdo del corazón. Posteriormente, los ratones se perfundieron vía intracardiaca con solución salina 0,9% durante 5 min, seguido de una solución fijadora (Fijador de Somogyi modificado sin glutaraldehído; ver en Anexo I) compuesta por 4% paraformaldehído (p/v) y 15% ácido pícrico saturado (v/v; Panreac) en tampón fosfato (PB³¹) 0,1 M, a pH 7,4 durante 15 min. Para la perfusión se empleó una bomba peristáltica Minipuls 3 modelo M312 (Gilson, Middleton, EE. UU.) con un flujo constante de 6-9 ml/min (en función del peso corporal del animal).

TABLA 9. Secuencias de los primers utilizados en la técnica qPCR para los estudios *in vivo*. Abreviaturas: *Arg1*, arginase 1; *Ccl2*, chemokine (c-c motif) ligand 2; *Ccr2*, chemoattractant receptor 2; *Cd200r*, cluster of differentiation receptor 200; *Cd206*, cluster of differentiation 206; *Cd68*, cluster of differentiation 68; *Cx3cr1*, fractalkine/cx3c receptor 1; *Dap12*, dnax activator protein 12 kDa; *Gadph*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *Iba1*, ionized calcium binding adaptor molecule 1; *Il-1β*, interleukin 1 beta; *Inos*, inducible nitric oxide synthase; *P2ry6*, pyrimidineric receptor p2y6; *Tlr2*, toll-like receptor 2; *Tlr4*, toll-like receptor 4; *Tmem119*, transmembrane protein 119; *Tnf-α*, tumour necrosis factor α; *Trem 2*, triggering receptor expressed on myeloid cells 2.

³¹ Del inglés *Phosphate Buffer*.

Materiales y métodos

Posteriormente se extrajo el encéfalo completo de cada animal y se dividió en tres partes (rostral, medial y caudal) mediante cortes coronales en una matriz de cerebro de ratón (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, EE. UU.). Dichas partes se mantuvieron en postfijación en la misma solución fijadora durante 2 h, en agitación y a T^a ambiente. A continuación, el tejido se lavó con PB hasta eliminar el exceso de fijador y, por último, las distintas partes del encéfalo se sumergieron en una solución crioprotectora de 30% sacarosa (p/v; Panreac) en PB durante 24 h a 4 °C y en agitación hasta que los bloques de tejido se hubieran sumergido completamente. Por último, el tejido se congeló con nitrógeno líquido y se conservó a -80 °C hasta el momento de su uso.

Seccionamiento

Los análisis histológicos se realizaron en secciones parasagitales de cerebelo y en secciones coronales de BO, ambas de 30 µm de grosor. Para ello, se utilizó un microtomo de deslizamiento modelo Jung SM 2000 (Leica Instruments) acoplado a una unidad de congelación “Frigomobil” (Leica Instruments), a una temperatura de entre -25 y -10 °C. Las secciones obtenidas se recogían en flotación en PB de forma seriada en placas de 24 pocillos. A continuación, las secciones se lavaron con PB para eliminar los restos del fijador y de sacarosa. Por último, las secciones se almacenaron a -20 °C en una mezcla congeladora compuesta por 30 % glicerol (v/v; VWR) y 30% polietilenglicol (v/v; VWR) en PB hasta su procesamiento histológico.

Inmunofluorescencia indirecta

Para la detección y caracterización de los diferentes tipos microgliales, basándonos en la expresión de epítomos antigénicos característicos, se empleó la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Para todos los análisis histológicos cuantitativos se emplearon cuatro secciones mediales de vermis cerebeloso y cuatro secciones mediales de BO para cada grupo de estudio. Para ello, las secciones almacenadas a -20 °C se lavaron en tampón fosfato salino (PBS³²) a T^a ambiente para retirar los restos de mezcla congeladora. Posteriormente, las secciones de tejido se incubaron en agitación constante con los anticuerpos primarios correspondientes (**Tabla 10**) diluidos en PBS con 5% suero de

³² Del inglés *Phosphate Buffered Saline*.

burro (v/v) y 0,2 % Tritón X-100 (v/v) durante 72 h a 4 °C. A continuación, las secciones se lavaron en PBS y se incubaron en agitación con el antisuero secundario que contenía los anticuerpos secundarios correspondientes (todos ellos hechos en burro; **Tabla 10**) diluidos 1:500 en tampón fosfato salino (PBS), durante una hora a T^a ambiente y oscuridad. Diez minutos antes de la incubación con el antisuero secundario, a cada pocillo se le añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una dilución de 1:10.000 para contrateñir los núcleos celulares. Tras realizar un nuevo lavado con PBS, las secciones se montaron en portaobjetos gelatinizados y se cubrieron con un medio antidesvanecimiento constituido por 70% glicerol (v/v), 5% n-propil-galato (p/v), 0,42% glicina (v/v) y 0,03% azida sódica.

TABLA 10. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Anticuerpo 1º	Especie	Origen	Dilución	Anticuerpo 2º	Origen	Dilución
CD16/32	Rata	BD	1:200	Anti-IgG de rata Cy3	Jackson	1:500
CD206	Cabra	R&D Systems	1:200	Anti-IgG de cabra Cy2	Jackson	1:500
CD45	Rata	Bio-Rad	1:1.000	Anti-IgG de rata Cy2	Jackson	1:500
IBA1	Conejo	Wako	1:1.000	Anti-IgG de conejo Cy3	Jackson	1:500

Estudio *in vivo* de la interacción microglía-neurona

Una vez caracterizada la microglía *in vitro* e *in vivo*, los estudios se centraron en el análisis de las interacciones microglía-neurona en el ratón PCD tanto en el cerebelo como en el BO. Con este propósito, se utilizaron 4 ratones WT y 4 PCD para cada una de las edades de estudio: P15, P25 y P40 en el caso del cerebelo, y P40, P70 y P120 para el BO. Para ello, se realizaron una serie de análisis génicos que se mostrarán a continuación.

Análisis génicos

Estos análisis se realizaron para conocer el nivel de expresión de genes relacionados con la comunicación entre la microglía y las neuronas (**Tabla 11**).

Para conocer los niveles de expresión de dichos genes se realizó la qPCR tal cual como se explicó anteriormente en la sección de análisis génicos de los experimentos *in vivo*. De hecho, el cDNA utilizado para medir los niveles de expresión de estos genes (**Tabla**

11) fue el mismo que el utilizado anteriormente, con el objetivo de usar el menor número posible de animales.

TABLA 61. Secuencias de los primers utilizados en la técnica de la qPCR para el análisis de los genes relacionados con los ejes funcionales de comunicación microglía-neurona. Los colores que se muestran en la tabla indican los diferentes ejes microglía-neurona analizados: en azul *ccl2-ccr2*; en naranja *cd200-cd200r*; en amarillo *cx3cl1-cx3cr1*. Abreviaturas: *Ccl2*, chemokine (c-c motif) ligand 2; *Ccr2*, chemoattractant receptor 2; *Cd200*, cluster of differentiation 200; *Cd200r*, cluster of differentiation receptor 200; *Cx3cl1*, fractalkine/cx3c chemokine ligand 1; *Cx3cr1*, fractalkine/cx3c receptor 1.

Gen	Oligo sentido 5' - 3'	Oligo antisentido 5' - 3'	Referencias
<i>Ccl2</i>	TGTTGGCTCAGCCAGATGCAGTTA	TACAGCTTCTTTGGGACACCTGCT	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Ccr2</i>	CTCTGCAAACAGTGCCAGTT	AACCGAGACCTCTTGCTCCCC	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd200</i>	CATAGGATGCATTTGTCTTTTGAAA	GCTGCATTTATCCTCCTCAATA	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cd200r</i>	CATAGGATGCATTTGTCTTTTGAAA	GCTGCATTTATCCTCCTCAATA	Yanguas-Casás et al., 2020
<i>Cx3cl1</i>	ATTGGAAGACCTTGCTTTGG	GCCTCGGAAGTTGAGAGAGA	Zhang et al., 2018
<i>Cx3cr1</i>	TGTCCTTTCTTTGTGAACATGA	GGCGGCGGCCATCTT	Yanguas-Casás et al., 2020

Tratamiento farmacológico: administración del inhibidor de la microglía PLX5622

Finalmente, se llevó a cabo la administración del fármaco denominado PLX5622 (MedChemExpress, Monmouth Junction, EE. UU.). Este compuesto es un inhibidor del CSF-1R lo que permite la eliminación prolongada y específica de las células de microglía (Carroll et al., 2018; Spangenberg et al., 2019; Ali et al., 2022; Basilico et al., 2022; Stojiljkovic et al., 2022; Church et al., 2023). En nuestro caso, su administración se realizó para analizar un posible efecto de la ausencia de microglía sobre la degeneración de las células de Purkinje del cerebelo en el ratón PCD, dada la microgliosis exacerbada que se produce en condiciones normales (ver [Introducción](#); Baltanás et al., 2013). Para ello, se

comenzó a administrar el inhibidor antes de que las células de Purkinje comenzaran a morir. Debido a que el inhibidor PLX5622 presenta muy poca solubilidad, se utilizó aceite de maíz (MedChemExpress) como vehículo para su administración. En primer lugar, se realizaron una serie de pruebas previas para poner a punto la pauta de administración del fármaco, de manera que eliminase la microglía en un corto periodo de tiempo con las siguientes premisas: (1) la supervivencia del animal, (2) no bajar del 90% del peso inicial y (3) la ausencia de periodos prolongados de inmovilidad que pudiesen indicar dolor o sufrimiento. Con todo ello, se observó que la mejor forma de administrar el inhibidor de la microglía era cada 72 h a una dosis de 50 mg/kg comenzando a la edad de P15, hasta P24 (Fig. 22). Durante la administración del fármaco se realizaron una serie de pruebas de comportamiento y, finalmente, tras el sacrificio de los ratones a la edad de P25, se realizó un análisis inmunohistoquímico para comprobar el efecto del tratamiento sobre la degeneración cerebelosa del ratón PCD (Fig. 22).

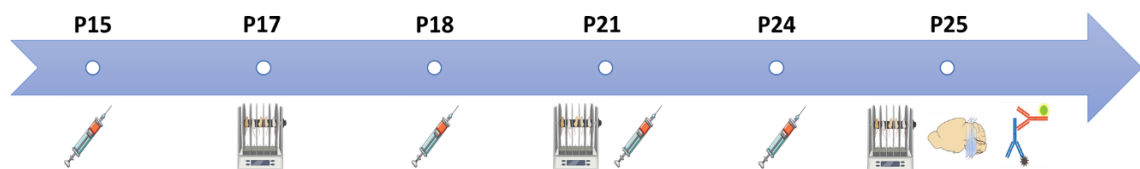


FIGURA 22. Línea temporal que muestra los días correspondientes a la administración del inhibidor microglial PLX5622. Jeringuilla, días de administración del inhibidor PLX5622; máquina Rotarod, días de realización de las pruebas motoras; encéfalo y anticuerpos, día de sacrificio de los animales y posterior procesado de las muestras para la realización de la inmunohistoquímica.

Los estudios sólo se focalizaron en el cerebelo debido a dos motivos: las edades de estudio eran menores que en el caso del BO (se podían obtener resultados en menos tiempo), y la neurodegeneración/neuroinflamación era más pronunciada y exacerbada que en el BO (el posible efecto de la eliminación de la microglía debería ser más evidente).

Para realizar todos estos experimentos, se utilizaron 6 ratones WT, 6 ratones PCD, 6 ratones WT administrados con PLX5622, 6 ratones PCD administrados con PLX5622, 6 ratones WT administrados con el vehículo y 6 ratones PCD administrados con el vehículo. Todos los animales realizaron las pruebas de comportamiento para posteriormente, sacrificarlos, y destinarlos para los estudios de inmunohistoquímica.

Prueba de comportamiento motor: prueba de la varilla giratoria o test Rotarod

Para comprobar si con la administración del inhibidor microglial PLX5622 se producía algún cambio en el comportamiento motor de los animales, se realizó la prueba de la varilla giratoria o test Rotarod. Específicamente, esta prueba se empleó para analizar la habilidad motora de los ratones (Schönfeld et al., 2017; Muñoz-Castañeda et al., 2018) a las edades de P17 (antes de la neurodegeneración de las células de Purkinje), P21 (etapa temprana de la degeneración de las células de Purkinje) y P24 (etapa donde la neurodegeneración de las células de Purkinje es máxima).

El aparato RotaRod LE8200 (Panlab, Barcelona, España) consiste en una barra moleteada giratoria de 3,5 cm de diámetro colocada horizontalmente a 25 cm de la base del dispositivo, junto con unos discos separadores perpendiculares a la barra que permiten colocar varios ratones a la vez sin que interactúen entre ellos mientras realizan la prueba (Fig. 22). Los ratones se colocaron en cada uno de los carriles sobre la varilla la cual giraba a una velocidad inicial de rotación constante de 4 rpm. Una vez que todos los animales estaban colocados y caminaban sobre la barra, se comenzaba la prueba en la que la velocidad de rotación aumentaría con una aceleración de 3,6 rpm/min pasando de 4 a 40 rpm en un tiempo de 10 min.

Para realizar adecuadamente la prueba, el ratón debe desplazarse en el sentido opuesto al giro de la varilla para evitar caerse. Cuando un ratón cae, acciona una plataforma basculante que se encuentra en la base del dispositivo, lo que permite registrar la velocidad máxima de rotación del rodillo y el tiempo que tarda en caerse de la barra de forma independiente para cada animal. Cada ratón realizó la prueba 7 veces (con intervalos de descanso de 5-10 min). Con esto, se obtuvieron 7 tiempos de latencia diferentes calculándose su media para cada animal y para cada edad analizada.

Todo el material utilizado en dicha prueba se limpió con etanol al 70% (v/v) para minimizar la influencia de olores en la realización de la prueba.

Análisis inmunohistoquímico

El siguiente estudio fue analizar mediante inmunohistoquímica indirecta el estado de la microglía y de las células de Purkinje después de la administración del fármaco PLX5622.

Para obtener el tejido nervioso, se siguió el mismo protocolo explicado anteriormente en el apartado de [Análisis histológicos de la parte *in vivo*](#). Por tanto, una vez que se obtuvieron las secciones de cerebelo correspondientes, se realizó una inmunohistoquímica doble con anticuerpos contra calbindina e Iba1 (para el marcaje de las células de Purkinje y de la microglía, respectivamente; [Tabla 12](#)).

TABLA 7. Anticuerpos utilizados para el estudio de las células de Purkinje (Calbindina D-28k) y de las células microgliales (Iba1) en el cerebelo de ratones tratados con PLX5622.

Anticuerpo 1º	Especie	Origen	Dilución	Anticuerpo 2º	Origen	Dilución
Calbindina D-28k	Ratón	Swant	1:1000	Anti-IgG de ratón Cy3	Jackson	1:500
Iba1	Conejo	Wako	1:1000	Anti-IgG de conejo Cy3	Jackson	1:500

Visualización al microscopio y análisis de las imágenes *in vivo*

Una vez procesadas, las secciones de tejido se observaron con el microscopio confocal STELLARIS 8, con el que se tomaron imágenes adecuadas para su posterior análisis con los programas Adobe Photoshop CC 2020 y FIJI.

Para el estudio de las células de microglía, se tomaron imágenes a diferentes aumentos dependiendo del tipo de análisis que se fuera a realizar. Por una parte, para el análisis de la microglía general (marcaje con Iba1) y de sus fenotipos (CD45, CD206, CD16/32) se capturaron imágenes en mosaico a un aumento de 20X y de 40X, y a una resolución de 1.024 x 1.024 píxeles. Asimismo, se tomaron imágenes en 12 planos focales a lo largo de 30 µm de profundidad (*Z-Stack*), para abarcar todo el grosor de las secciones. Este sistema de toma de imágenes permitió realizar diferentes cuantificaciones: (1) el cálculo de la densidad de células microgliales (células Iba1+/mm²), (2) la densidad integrada del marcador de microglía reactiva CD45 (es decir, la intensidad de fluorescencia de dicho marcador utilizando la herramienta “*Threshold*” del programa FIJI), y (3) el porcentaje de expresión para el marcador proinflamatorio CD16/32 (células doblemente marcadas para Iba1 y CD16/32 / total de células Iba1+) y para el marcador antiinflamatorio CD206 (células doblemente marcadas para Iba1 y CD206 / total de células Iba1+).

Por su parte, para el estudio de las células de Purkinje se tomaron imágenes en mosaico a un aumento de 40X, y a una resolución de 1.024 x 1.024 píxeles, haciendo de nuevo

Materiales y métodos

un *Z-Stack* de 12 planos focales en 30 μm de espesor. El análisis cuantitativo realizado con dichas neuronas se basó en el conteo del número de células de Purkinje a lo largo de su capa correspondiente. Además, también se cuantificó el porcentaje de área ocupado por el soma y las dendritas de estas neuronas en las capas molecular y de las células de Purkinje. Para ello, se calculó el área ocupada por dichas neuronas mediante la herramienta “*Threshold*” (Fiji) para después referirla al área total de ambas capas cerebelosas, obteniéndose así el porcentaje de ocupación.

Todos los conteos celulares y las variables cuantificadas se realizaron en una sección de vermis o de la parte más medial del BO (Bregma 4.745; [Atlas Allen Brain](#)). Dado el tamaño de las secciones del cerebelo, el análisis se centró en los lóbulos I-II, V, VIII y X, como representativos de cada región cerebelosa (ver [Introducción](#); [Fig. 11](#)). En el caso del BO, se analizaron las secciones correspondientes a las regiones más mediales. A su vez, también se consideró la distribución de la microglía por capas tanto en la corteza cerebelosa (capa molecular + capa de las células de Purkinje vs. capa de los granos) como en el BO (capa glomerular vs. capa plexiforme externa + capa de las células mitrales + capa plexiforme interna vs. capa de los granos).

Análisis estadísticos de los experimentos *in vivo*

Debido a la variedad de pruebas estadísticas empleadas, en cada sección de resultados se indicará el análisis utilizado para cada experimento. Todos los datos se representaron como la media \pm la desviación estándar (DS).

En todos los casos se comprobó la normalidad y la homocedasticidad de la muestra con las pruebas de Shapiro-Wilk y de Levene, respectivamente. Los datos que cumplieron los supuestos de normalidad y homocedasticidad ($p > 0,05$ para las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene), se analizaron con las pruebas paramétricas t de Student o ANOVA seguido del análisis *post hoc* de Bonferroni, en función del número de grupos experimentales a comparar. Por el contrario, cuando los datos no cumplieron el supuesto de normalidad y/o homocedasticidad ($p < 0,05$ para las pruebas de Shapiro-Wilk y/o Levene), se utilizaron las pruebas no paramétricas U de Mann-Whitney o Kruskal-Wallis, dependiendo del número de grupos experimentales a comparar. Para todas ellas, el nivel de significación estadística mínima se estableció en $p < 0,05$ considerándose altamente significativo en $p < 0,01$. Todos los análisis estadísticos y

representaciones gráficas se realizaron con el software SPSS versión 26 para Windows, GraphPad Prism versión 9.0.2 para Windows y Microsoft Excel versión 2021 para Windows.

DISCUSIÓN

En la presente Tesis Doctoral se ha estudiado en profundidad la microglía del ratón PCD tanto escenarios *in vitro* como en escenarios *in vivo*, siempre comparando condiciones fisiológicas y patológicas. Para ello, se han realizado análisis sobre determinadas características y/o funciones microgliales: diferenciación, morfología, expresión génica, expresión proteica, fagocitosis, motilidad, proliferación, número y distribución celular. Asimismo, se ha estudiado la relación microglía – neurona y el efecto de la eliminación de la microglía en condiciones patológicas.

Nuestros resultados han demostrado un comportamiento complejo de la microglía, en el que influyen tanto el gen *Ccp1*, como su tejido de origen, y el microambiente sano o en degeneración que la acompaña. Además, se ha comprobado que la supresión de la microgliosis es favorable ante un proceso de muerte neuronal agresivo. Tales resultados tienen importantes implicaciones en la fisiopatología de las enfermedades neurodegenerativas y merecen una discusión al efecto. Para una mejor comprensión de este trabajo y, consecuentemente, de la siguiente discusión, se ha realizado una clasificación simplificada de todas las características analizadas junto con los respectivos resultados obtenidos tanto en los estudios *in vitro* como en los estudios *in vivo* (Tablas 14 y 15).

Tabla 14. Resumen esquemático de los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*. En la tabla se recogen las características o funciones microgliales estudiadas junto con los resultados obtenidos en los cultivos de BMDML, de microglía aislada de la corteza cerebral, de microglía aislada del cerebelo y de microglía aislada del BO. + PCD, más elevado en el genotipo PCD en comparación con el WT; - PCD, menos elevado en el genotipo PCD en comparación con el WT; =, igual en ambos genotipos.

Experimento	BMDML	Microglía cortical	Microglía cerebelo	Microglía bulbo olfativo
Área celular	=	=	+ PCD	+ PCD
Intensidad	- PCD	- PCD	+ PCD	+ PCD
Fagocitosis	- PCD	+ PCD	+ PCD	+ PCD
Motilidad	+ PCD	+ PCD	+ PCD	+ PCD
Proliferación	+ PCD	+ PCD	No analizado	No analizado

Discusión

Tabla 15. Resumen esquemático de los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo*. En la tabla se recogen las características o funciones de la microglía estudiadas junto con los resultados obtenidos en el estudio de la microglía del cerebelo y del BO, así como de algunos de sus principales ejes de comunicación con las neuronas. + PCD, elevado en el genotipo PCD en comparación con el WT; ++ PCD, muy elevado en el genotipo PCD en comparación con el WT.

Experimento		Microglía cerebelo	Microglía bulbo olfativo
Análisis génico	Microglía general	++ PCD	+ PCD
	Fagocitosis	++ PCD	+ PCD
	Motilidad	++ PCD	+ PCD
	Respuesta innata	+ PCD	+ PCD
	Respuesta proinflamatoria	++ PCD	+ PCD
	Respuesta antiinflamatoria	+ PCD	++ PCD
Análisis inmunohistológico	Densidad microglía	++ PCD	+ PCD
	Microglía reactiva	++ PCD	+ PCD
	Microglía proinflamatoria	++ PCD	++ PCD
	Microglía antiinflamatoria	++ PCD	++ PCD
Ejes microglía - neurona	<i>Cx3cl1 – Cx3cr1</i>	++ PCD	+ PCD
	<i>Ccl2 – Ccr2</i>	++ PCD	+ PCD
	<i>Cd200 – Cd200r</i>	++ PCD	+ PCD

Para una mejor comprensión, el resto de la Discusión se realizará atendiendo por separado a la experimentación *in vitro* e *in vivo*, tal y como se ha ido haciendo a lo largo de esta Tesis Doctoral. En ningún caso ambos grupos de experimentos deben considerarse como independientes, ya que tratan de responder en conjunto a la misma hipótesis, por lo que siempre habrá referencias cruzadas entre ambas partes.

Experimentación *in vitro*

Como ya se ha comentado a lo largo de la presente Tesis Doctoral, para el estudio de la microglía del PCD se han utilizado diferentes cultivos celulares con el objetivo de dilucidar el efecto exclusivo de la mutación (cultivos de BMDML), de la mutación con influencia neural (cultivos de microglía aislada de la corteza cerebral), y de la mutación con influencia neural y daño neuronal (cultivos de microglía aislada del cerebelo y del BO).

Validez de los tipos de cultivos de microglía utilizados en cultivo

El gen *Ccp1* se expresa de forma elevada en varios tipos de células relacionadas con el sistema inmunitario, entre las que se encuentra la microglía (Baltanás et al., 2021; <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000135049-AGTPBP1/single+cell+type>). Así pues, *Ccp1* debe de ser relevante para la realización de las funciones de este sistema. Sin embargo, hoy en día, según nuestro conocimiento, se desconoce con qué tipo de funciones microgliales específicas se relaciona este gen. Por ello, se ideó un modelo *in vitro* que nos permitiera estudiar los efectos de la mutación de *Ccp1* por sí misma en las células de microglía, sin la intervención de un ambiente neural que pudiera condicionar los resultados obtenidos. La razón es que diversos estudios demuestran que las neuronas condicionan el comportamiento de las células de microglía debido a la comunicación que establecen las unas con las otras (Eyo et al., 2013; Szepesi et al., 2018). Dado que el ratón PCD sufre alteraciones neuronales, era necesario controlar esta variable. Así pues, se optó por el uso de las células de BMDML. Este tipo de células se obtuvieron a partir de células madre hematopoyéticas procedentes de la médula ósea y, por esta razón, nunca habían estado en contacto con un ambiente neural. Además, en investigaciones previas se había demostrado que las células de BMDML son un buen modelo de estudio microglial al presentar características propias de la microglía referentes a su morfología, expresión proteica, fagocitosis, motilidad, proliferación y respuesta inmunitaria (Hinze y Stolzing, 2011; Hinze y Stolzing, 2012; Kobashi et al., 2022).

Una vez analizado el efecto del gen *Ccp1* por sí mismo sobre el funcionamiento de la microglía, se quiso estudiar este mismo efecto en un nivel mayor de complejidad biológica: en microglía que hubiera estado previamente en contacto con un ambiente neural sano, ya que cada vez hay más pruebas que demuestran que las neuronas informan a la microglía sobre su estado, de manera que son capaces de controlar recíprocamente su activación y motilidad (Eyo et al., 2013; Szepesi et al., 2018). Por tanto, se quiso observar el comportamiento de la microglía de tipo PCD que hubiese estado en presencia de un ambiente neural, para observar así si la mutación *Ccp1* afecta a características propias de la microglía en un contexto fisiológico (sano). Para este

Discusión

propósito, se utilizaron células de microglía procedentes de la corteza cerebral de ratones neonatales. Se utilizó la microglía proveniente de esa región nerviosa porque en el ratón PCD no presenta alteraciones ni procesos neurodegenerativos (Berezniuk et al., 2010), y menos aún en un momento en el que ninguna otra neurodegeneración se ha manifestado aún (Wang y Morgan, 2007; Baltanás et al., 2021). Así pues, estaríamos hablando de microglía que durante su desarrollo habría estado en contacto con un ambiente neural sano.

Para concluir el conjunto de estudios *in vitro*, una vez analizado el efecto de la mutación *Ccp1* sobre el funcionamiento de la microglía *per se* y con la influencia de un ambiente neural sano, se quiso estudiar el influjo del contacto con un ambiente neural patológico. Para ello, se utilizó microglía aislada del cerebelo y del BO en las edades de máxima neurodegeneración de las células de Purkinje (P25) y de las células mitrales (P70), respectivamente. Gracias al uso de estos dos cultivos celulares, pudimos entender el comportamiento de la microglía de los ratones PCD frente a un estímulo patológico, para dilucidar si este tipo celular potencia o disminuye dicho estímulo.

En resumen, gracias al uso de estos tres tipos de cultivos celulares, se estudiaron diversas características (diferenciación, expresión génica, expresión proteica y morfología) y funciones (fagocitosis, motilidad, proliferación y respuesta inmunitaria) microgliales típicas. Para facilitar la comprensión de este apartado, se discutirá cada una de estas características o funciones por separado haciendo hincapié en cada uno de los cultivos de microglía empleados.

La expresión génica y proteica de las células de microglía de tipo PCD se encuentra alterada

Lo primero que se observó en todos los cultivos realizados, es que tanto la expresión génica y proteica de marcadores microgliales fenotípicos o funcionales se encontraba alterada (al alza o a la baja) en las células de tipo PCD en comparación con las células de tipo WT.

Específicamente, se vio que las células madre hematopoyéticas de la médula ósea de los ratones PCD no se diferenciaban de la misma forma hacia BMDML tal y como lo hacían las células procedentes de los ratones WT. En las células de BMDML de tipo PCD se

observó una menor expresión tanto a nivel génico como a nivel proteico de marcadores microgliales generales (en especial de Iba1) en comparación con las células de tipo WT. Por tanto, desde un inicio, se pensó que la mutación en el gen *Ccp1* podría afectar a los procesos de diferenciación celular. En estudios previos de nuestro laboratorio ya se había demostrado que esta mutación provoca un retraso en la diferenciación y maduración neuronal, en concreto de las células de Purkinje del cerebelo de los ratones PCD (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Más adelante, el estudio se extendió al sistema inmunológico, observándose que las células mieloides del ratón PCD presentan una inmadurez estructural y funcional al encontrarse en un estado más indiferenciado que las células mieloides de tipo WT (Del Pilar et al., 2021). Asimismo, otras investigaciones demuestran que la deficiencia de la enzima CCP1 interviene en los procesos de diferenciación celular promoviendo, por un lado, la formación de células pluripotentes inducidas y, por otro lado, favoreciendo el mantenimiento del estado pluripotencial de las células madre embrionarias (Ye et al., 2018). Entonces, el gen *Ccp1* podría estar interviniendo en el proceso de diferenciación de las células madre hematopoyéticas de la médula ósea hacia BMDML, manteniéndolas más hacia un estado de célula madre indiferenciada que hacia uno microglial. Diversas investigaciones ponen de manifiesto la importancia de los microtúbulos en los procesos de diferenciación celular (Muroyama y Lechler, 2017; Hlavaty y Lechler, 2021; Akhmanova y Kapitein, 2022). Precisamente, las células de tipo PCD, al presentar mutado el gen *Ccp1*, enzima encargada de la despoliglutamilación de las tubulinas, probablemente presenten algún tipo de alteración en su citoesqueleto (Muñoz-Castañeda et al., 2018), haciendo que los procesos de diferenciación no se produzcan adecuadamente.

Por otro lado, la expresión de Iba1 en las células de BMDML de tipo PCD se encontró muy disminuida tanto a nivel génico como a nivel proteico. Iba1 ha sido y es ampliamente utilizado para marcar la microglía en las distintas partes del SNC en diferentes patologías (Shapiro et al., 2009; Jurga et al., 2020; Lier et al., 2021; Pérez-Martín et al., 2023). Hoy en día, no se conoce su función exacta, pero sí se sabe que es una proteína ligante de calcio del citoesqueleto, que actúa como proteína de enlace cruzado de actina (Gheorghe et al., 2020). Asimismo, hay estudios previos que demuestran que la distribución de Iba1 por el citoplasma depende, en parte, de la dinámica del citoesqueleto. Es posible que la mutación en el gen *Ccp1* produzca una

Discusión

hiperglutamilación de las tubulinas que derive en una desestabilización de los microtúbulos de la microglía, al igual que ocurre en las células de Purkinje (Berezniuk et al., 2012; Muñoz-Castañeda et al., 2018) y, por tanto, una desestabilización del citoesqueleto. Esto podría motivar una alteración en la distribución celular de Iba1, lo que desembocaría en unos niveles inadecuados de este marcador.

Finalmente, *Tmem119* también presentó una menor expresión en las células de BMDML de tipo PCD. Varios estudios recientes han demostrado que en condiciones homeostáticas la microglía expresa intensamente *Tmem119*, pero sus niveles de expresión se reducen considerablemente en algunos contextos patológicos que cursan con neurodegeneración y procesos de neuroinflamación, como ocurre en la enfermedad de Naso-Hakola (Sato et al., 2019) o en traumatismos encefálicos (Mercurio et al., 2022). Por lo tanto, la elevada expresión génica de mediadores proinflamatorios que se observa en las células de BMDML de tipo PCD podría comprometer los niveles de expresión referentes a *Tmem119*.

En el caso de la microglía aislada de la corteza cerebral, también se observó una menor expresión proteica de Iba1 en las células de tipo PCD. Así pues, si aceptamos la hipótesis propuesta anteriormente, el citoesqueleto de las células microgliales del ratón PCD podría encontrarse alterado debido a la mutación en el gen *Ccp1*, lo que podría influir en los niveles de Iba1. De este modo, la microglía cortical no adquiriría un estado de madurez completo -como sucede en el caso de las células de BMDML- por lo que expresaría unos niveles más bajos de Iba1. Por otro lado, en determinadas patologías se ha observado una expresión anómala o, incluso, una ausencia de expresión de Iba1 en la microglía de ciertas regiones encefálicas (Hendrickx et al., 2017; Lier et al., 2019; Swanson et al., 2020; Amaya et al., 2021). Esto mismo podría estar sucediendo en nuestro modelo animal, ya que su mutación, causante de patologías neurales, también podría provocar una expresión anómala de Iba1 en la microglía de las regiones corticales.

Sin embargo, al estudiar la expresión de Iba1 en las células aisladas del cerebelo y del BO durante los periodos de máxima neurodegeneración del PCD, sucedió todo lo contrario. En ambos casos, se observó una mayor expresión de Iba1 en las células de tipo PCD en comparación con las de tipo WT, probablemente como respuesta a los procesos de neurodegeneración. Este mismo hecho ocurre en ambos escenarios *in vivo*,

ya que durante la fase degenerativa se observa una expresión muy elevada del gen *Iba1* (Tabla 15; ver más adelante). Este fenómeno se ha demostrado en otras patologías del sistema nervioso donde la microglía, en respuesta a un estímulo patológico, aumenta los niveles de expresión génica y proteica de *Iba1* (Michalski et al., 2017; Ousta et al., 2022). De hecho, la expresión *in vivo* de *Iba1* es especialmente elevada en el cerebelo (Tabla 15), con una degeneración más agresiva, lo que apoya esta explicación.

En resumen, la expresión de algunos marcadores microgliales fenotípicos se encuentra disminuida en la microglía de tipo PCD en condiciones fisiológicas, pero en condiciones patológicas la expresión de estos marcadores se dispara, probablemente como efecto de la activación inmunológica.

El ambiente neurodegenerativo del PCD desencadena una hipertrofia microglial

En primer lugar, es necesario resaltar que los valores de área celular encontrados en cada uno de los cultivos de microglía nos parecieron muy elevados en comparación con los valores observados en la microglía de los escenarios *in vivo*: como su propio nombre indica, las células microgliales son pequeñas, pero en cultivo llegaron a alcanzar tamaños de hasta alrededor de 600 μm^2 . Así pues, realizamos una búsqueda bibliográfica exhaustiva para corroborar la verosimilitud de nuestras mediciones. Corroboramos que nuestros datos eran similares a los obtenidos en otras investigaciones donde trabajan con cultivos de microglía similares a los utilizados en la presente Tesis Doctoral (Hinze y Stolzing, 2011; Hinze y Stolzing, 2012; Bohlen et al., 2019; Goshi et al., 2020; Montilla et al., 2020; Vijaya et al., 2023). Entonces, nuestras medidas se han efectuado adecuadamente, y los valores obtenidos se deben a la disposición bidimensional de la microglía en los cultivos, cosa que no ocurre en los modelos *in vivo* donde este tipo celular adquiere una conformación tridimensional. Además, se halló que la microglía de los ratones PCD presentaba mayor área, lo que probablemente se deba a un estado de hipertrofia y mayor activación microglial asociado a las morfologías ameboide e hiperramificada (Green et al., 2022; Vidal-Itriago et al., 2022).

Al analizar la morfología de las células en cultivo, observamos que las células de BMDML y la microglía aislada de la corteza cerebral no diferían entre los grupos experimentales,

Discusión

mientras que la microglía procedente del cerebelo y del BO de los ratones PCD presentaba llamativamente una morfología diferente a la de las células procedentes de los ratones WT. En concreto, las células de tipo PCD presentaban principalmente morfologías ameboides o muy ramificadas. Ambos tipos de morfologías se podrían asociar a un estado de activación microglial causado por la degeneración tanto de las células de Purkinje como de las células mitrales. De hecho, en determinadas patologías nerviosas la adquisición de una morfología amebode o hiperramificada se asocia a estados de activación o de hiperactivación microglial (Paasila et al., 2019; Illes et al., 2020; Vidal-Itriago et al., 2022).

Así pues, se hace evidente que sólo cuando hay influencia de daño neural, el tamaño y la forma de la microglía del PCD cambian respecto a la WT, adquiriendo un fenotipo de activación

La microglía de tipo PCD presenta una capacidad fagocítica alterada y dependiente de su origen

Las células de BMDML de tipo PCD presentaron una menor capacidad fagocítica respecto a sus homólogas WT, tanto a nivel génico como en el ensayo de fagocitosis con microesferas fluorescentes. Por tanto, la mutación en el gen *Ccp1* también compromete la capacidad fagocítica de la microglía, lo que podría agravar el desarrollo de una determinada patología nerviosa, como es el caso de la muerte neuronal primaria del ratón PCD. Esto ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas tales como algunos tipos de accidentes cerebrovasculares (Beccari et al., 2023) o en la enfermedad de Parkinson (Guo et al., 2019), donde se ha observado que un defecto en la capacidad fagocítica de la microglía promueve una mayor neurodegeneración e inflamación. Además, la disminución de la capacidad fagocítica puede estar influida por la menor diferenciación de las células de BMDML de tipo PCD, ya que una menor especialización microglial provoca un menor desarrollo de sus funciones. Este fenómeno ocurre en otros tipos de células inmunitarias como los linfocitos, donde se observa que la capacidad fagocítica depende del grado de diferenciación/especialización en el que se encuentren (Wu et al., 2019). Además, se observó que las células de BMDML de tipo PCD presentaban una menor expresión del gen antiinflamatorio CD206. En determinadas

condiciones, la expresión de genes antiinflamatorios se relaciona directamente con un aumento de la fagocitosis en las células de microglía (Deng et al., 2015; Tanaka et al., 2021), por lo que la menor expresión de estos genes también podría redundar en la reducción de su fagocitosis. Una vez más, también hay que tener en cuenta que la fagocitosis es un proceso mediado por el citoesqueleto de las células (Franco-Bocanegra et al., 2019; Möller et al., 2022). Tal y como se ha discutido anteriormente, la desestabilización de los microtúbulos presente en algunos tipos celulares del ratón PCD (Berezniuk et al., 2012; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Del Pilar et al., 2021; Ramadan et al., 2021) también podría manifestarse en las células de BMDML, influyendo en la correcta realización de los procesos de fagocitosis. Investigaciones muy recientes ponen de manifiesto la importancia de los microtúbulos en el correcto funcionamiento de la microglía tanto en un estado homeostático como en un estado activado (Rosito et al., 2023). En concreto, se ha observado que la dinámica y reorganización de los microtúbulos es esencial para llevar a cabo una respuesta inflamatoria adecuada (Adrian et al., 2023).

Por el contrario, las células de microglía aisladas de la corteza cerebral y las aisladas del cerebelo y BO presentaron valores más altos de fagocitosis en el fenotipo PCD (Tabla 14). Ello hace pensar que el ambiente neuronal -incluso sin ningún tipo de daño- es el responsable de este cambio radical en la capacidad fagocítica de las células de tipo PCD. Es decir, aunque la mutación en el gen *Ccp1* pueda ser la responsable de una reducción basal en la actividad fagocítica de la microglía, el ambiente neural la potencia, superando la capacidad de las células silvestres. En el caso de las células de microglía aisladas de la corteza cerebral, la baja expresión de *Iba1* podría influir en este factor, ya que en investigaciones previas se observa que al silenciar el gen *Iba1* en células de microglía *in vitro*, ésta adquiere una mayor capacidad fagocítica (Gheorghe et al., 2020). Si bien, este razonamiento entraría en conflicto con lo que ocurre en la BMDML, ya que a pesar de que estas células tienen una expresión muy baja de *Iba1*, presentan una capacidad fagocítica muy reducida. Por lo tanto, es probable que exista alguna interacción o efecto neural que haga que la microglía del PCD adquiera una fagocitosis mayor. Esta interacción sería especialmente relevante en el caso de existir un daño neuronal, ya que las células cultivadas desde el cerebelo o el BO, aunque con valores elevados de *Iba1*, tienen una alta fagocitosis (Tabla 14). Además, este hecho se apoya con nuestros datos

Discusión

in vivo, donde también se detectó una elevada expresión de *Iba1* y de genes relacionados con la fagocitosis, especialmente en el cerebelo, con una degeneración mayor (ver más adelante).

Además, no se debería de descartar que el aumento de la capacidad fagocítica de las células de tipo PCD se deba a un efecto inflamatorio sistémico ya que en investigaciones previas se demuestra que el ratón PCD presenta alterado su sistema inmunitario periférico (Del Pilar et al., 2021). Esto podría desencadenar una cascada de señalización entre las células de dicho sistema con la microglía provocando su activación y, por ende, su capacidad fagocítica (Hoogland et al., 2015; Dionisio-Santos et al., 2019; Zang et al., 2022; Qiu et al., 2023). Además, aún sin que las neuronas estén afectadas y el ambiente neural sea sano en sí mismo, puede existir una influencia periférica que podría modular el comportamiento de la microglía cortical (Yang et al., 2020; Zang et al., 2022). En el caso de la microglía aislada de la corteza cerebral, este tipo de microglía se ha desarrollado en un ambiente neural, por lo que otro factor que habría que considerar sería la comunicación de la microglía cortical con las neuronas circundantes (Szepesi et al., 2018). Nuestros resultados demostraron que en el cerebelo y BO de los ratones PCD la comunicación entre ambos tipos celulares se encuentra afectada, incluso antes del comienzo de los procesos neurodegenerativos.

Por último, con respecto a la microglía aislada del cerebelo y del BO, conviene recordar que para el análisis de su capacidad fagocítica se utilizaron neuronas corticales muertas para reproducir al máximo posible el ambiente degenerativo de estas regiones. Una vez más, se demostró que tanto la microglía aislada del cerebelo como del BO de ratones PCD fagocitaba más que su homóloga WT. Así pues, todo parece indicar que el ambiente neural basta para cambiar la capacidad fagocítica de las células de microglía, sin que los procesos de neurodegeneración influyan adicionalmente en este factor, al menos en condiciones *in vitro*. Si bien, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la parte de experimentos *in vivo*, todo parece indicar que la neurodegeneración tanto de las células de Purkinje como de las células mitrales motiva un aumento en la capacidad fagocítica de la microglía (ver más adelante). Asimismo, en los cultivos de microglía aislados tanto de cerebelo como de BO abundan las células ameboides, morfología que se relaciona en gran cantidad de patologías nerviosas con la microglía con actividad fagocítica elevada (Fu et al., 2014; Vidal-Itriago et al., 2022).

Las células de microglía de tipo PCD presentan una motilidad elevada

Las células de tipo PCD de todos los cultivos de microglía realizados resultaron tener una mayor motilidad que las células de tipo WT. Además, en el caso de las células de BMDML, este hecho se observó tanto de forma potencial en los análisis génicos, como tras una evaluación directa mediante el uso de un microscopio con función *time-lapse*. Ambos resultados son congruentes con los obtenidos en el resto de los cultivos, lo que, valida, aún más si cabe, el uso de BMDML como modelo de células microgliales. Por lo tanto, la mutación *Ccp1* también parece estar interviniendo en la motilidad de la microglía, en este caso, elevándola. Como ya se ha comentado anteriormente, la proteína CCP1 es esencial para la estabilización de los microtúbulos del citoesqueleto (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Se sabe que los microtúbulos son capaces de restringir movimiento celular y especificar su direccionalidad (Ganguly et al., 2012). Esto explica que las células de BMDML de genotipo PCD presenten una motilidad más elevada e inespecífica al no presentar un control sobre la dinámica de los microtúbulos de su citoesqueleto. Además, como hemos visto, las células de BMDML de tipo PCD presentan una expresión baja de Iba1. Esta pequeña proteína de unión a actina desempeña un papel fundamental en la reorganización del citoesqueleto bajo la membrana plasmática, proceso esencial para la dinámica microglial (Ahmed et al., 2007; Köhler, 2007). Por tanto, en las células PCD, la baja expresión de Iba1 también podría alterar su motilidad. De hecho, en algunas investigaciones en las que se inhibe la expresión de Iba1 se ha observado que las células de microglía presentan una motilidad alterada en respuesta a un estímulo de ATP (Lituma et al., 2021). Por último, en las células de BMDML de tipo PCD se observó una expresión elevada de genes relacionados con una respuesta inmunitaria proinflamatoria. Ello podría contribuir a facilitar su motilidad, ya que, en determinadas patologías nerviosas, este tipo de respuesta provoca el reclutamiento y activación de la microglía hacia un determinado lugar, es decir, induce su desplazamiento (Parkhurst y Gan, 2010; Ferreira et al., 2012).

En las células de microglía aisladas de la corteza cerebral también se halló una mayor capacidad de movimiento en las células PCD en comparación con las WT. La explicación de este fenómeno puede ser exactamente la misma que para las células de BMDML: (1)

Discusión

una desestabilización de los microtúbulos y del citoesqueleto (Muñoz-Castañeda et al., 2018; Ganguly et al., 2012); y (2) una expresión baja de Iba1 (Ahmed et al., 2007; Köhler C, 2007).

Algo similar sucede con la motilidad de las células de microglía de tipo PCD aisladas tanto del cerebelo como del BO. Por tanto, resulta evidente que la mutación en el gen *Ccp1* produce una motilidad aumentada de la microglía, que podría estar relacionada con una desorganización de su citoesqueleto, como ocurre en otras células del mismo modelo animal (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Además de la influencia del gen *Ccp1*, en este caso habría que tener en cuenta la influencia del ambiente neurodegenerativo del que provienen dichas células, hecho que pudiera provocar que su motilidad se viera aún más incrementada en respuesta a los estímulos patológicos del cerebelo y BO, todo ello con el fin de atraer a la microglía hacia el lugar de la lesión (Hughes y Nibbs, 2018). Más aún, tanto la microglía aislada del cerebelo como del BO de los ratones PCD adquirió morfologías predominantemente ameboides. Esto también podría explicar el resultado observado, ya que las morfologías ameboides se relacionan con una mayor actividad microglial y, por ende, con una mayor capacidad de movimiento (Vidal-Itriago et al., 2022). Más aún, en los estudios *in vivo* durante las etapas degenerativas, la microglía adquiere mayoritariamente una morfología ameboide o hiperramificada (especialmente en el cerebelo).

Las células de microglía derivadas de la médula ósea de ratones PCD presentan una mayor capacidad de proliferación

En los estudios inmunocitoquímicos con Ki67 se observó que las células de BMDML de tipo PCD tenían una mayor capacidad de división que las de tipo WT. A su vez, los estudios con el compuesto *AlamarBlue* corroboraron lo anterior, al demostrar un mayor número de células de BMDML de tipo PCD a lo largo del tiempo en cultivo. Así pues, la mutación en el gen *Ccp1* parece aumentar la proliferación celular. Una posible explicación a este fenómeno es la menor diferenciación de las células de BMDML (ver más arriba), ya que al permanecer en un estado más indiferenciado probablemente posean una mayor capacidad proliferativa (Zhu y Skoutchi, 2001; Ye et al., 2018).

Asimismo, la mayor expresión de genes proinflamatorios en las células de BMDML de tipo PCD también puede contribuir a un aumento de la proliferación microglial (Jose et al., 2014; Monif et al., 2016).

Los resultados obtenidos con las células de microglía aisladas de la corteza cerebral fueron algo discrepantes, ya que ambos genotipos presentaban valores de proliferación similares en los estudios con Ki67. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre ambos genotipos en los experimentos con *alamarBlue*. En todo caso, los resultados obtenidos con este último compuesto no son del todo representativos, ya que las diferencias que hallamos entre los genotipos pueden deberse a una mayor senescencia de las células de microglía de tipo WT. De este modo, si sólo se considerasen los datos obtenidos con Ki67, nuestros resultados resultan contradictorios en ambos tipos de cultivo. Por tanto, a pesar de que la mutación en el gen *Ccp1* hace que la microglía tienda a proliferar más, un ambiente neuronal sano provocaría que esa proliferación se mantuviera en condiciones homeostáticas, similares a las observadas en los modelos WT. De hecho, en investigaciones previas, se puso de manifiesto que las neuronas, en condiciones fisiológicas sanas, mantienen la proliferación de la microglía inhibida y sólo en respuesta a un proceso patológico la activan (Wang et al. 2011; Oria et al. 2018). Así, los resultados con el *alamarBlue* adquirirían sentido en base a esta hipótesis, ya que la microglía aislada de la corteza cerebral, una vez abandonado el contacto neuronal previo (ejes de comunicación microglía-neurona), podría perder esa inhibición de la proliferación, entrando en juego tanto el efecto de la mutación *Ccp1* (proliferación) como una senescencia progresiva. De hecho, algo similar ocurre en el cerebelo y BO de los ratones PCD donde los ejes microglía-neurona se encuentran alterados (especialmente en el cerebelo) lo que induce una proliferación microglial, que una vez solucionado y restablecida la patología, se inhibiría nuevamente. Por lo tanto, la proliferación de la microglía en los escenarios *in vivo* no solo estaría motivada por la mutación en el gen *Ccp1*, sino también por la pérdida de la correcta señalización de la microglía con las neuronas.

En resumen, todos estos datos indican que la mutación en el gen *Ccp1* influye *per se* en el funcionamiento normal de la microglía del ratón PCD al alterar algunas funciones tales como la fagocitosis, motilidad y proliferación microglial. Es necesario resaltar que estas afectaciones se manifiestan en ausencia de ningún tipo de influencia neural y/o

Discusión

degenerativa. Probablemente, todo ello se deba, al menos en parte, a un mal funcionamiento del citoesqueleto, en concreto de los microtúbulos. Así pues, en futuros trabajos sería muy interesante estudiar la dinámica de los microtúbulos de las células de microglía del ratón PCD, ya que ayudaría a comprender el efecto de la mutación sobre el funcionamiento microglial (morfología, expresión génica y proteica, fagocitosis, motilidad, proliferación y respuesta inmunitaria, entre otras). Además, se corroboraría que el microambiente donde se encuentra la microglía es fundamental para la adquisición de un determinado fenotipo, como ya se ha observado en investigaciones previas (Hanamsagar y Bilbo, 2017; Chagas et al., 2020). De este modo, es muy importante el estudio de las señales que mantienen la microglía en un estado homeostático para así comprender cuáles se encuentran alteradas en los diferentes estados de una enfermedad. Gracias a esto, sería más sencillo atajar una determinada patología ya que controlando el microambiente, se podría controlar la microglía. Además, nuestros resultados indican que la microglía es una célula muy versátil, por lo que su estudio en modelos *in vitro* debería de considerarse siempre junto a un modelo *in vivo*, ya que incluso las pequeñas variaciones en el medio pueden ser determinantes para que este tipo celular adquiera unas determinadas características o funcionalidades. En este sentido, sería interesante completar nuestros resultados con el estudio de la expresión génica de las células de microglía aislada de corteza cerebral, cerebelo y BO al igual que se ha realizado con las células de BMDML. Esto nos ayudaría a comprender muchas de las características y funcionalidades que en estos tipos celulares observamos, desde un punto de vista génico.

Experimentación *in vivo*

Una vez realizados todos los estudios *in vitro*, se quiso observar el estado de la microglía de los ratones PCD directamente en escenarios *in vivo* antes, durante y después de los procesos neurodegenerativos que ocurren tanto en el cerebelo como en el BO.

La microglía del cerebelo y del bulbo olfativo de los ratones PCD presenta un expresión génica y proteica característica de los estados de activación de la microglía

Antes del inicio de los procesos neurodegenerativos, tanto en el cerebelo como en el BO, se observó una expresión génica elevada de algunos marcadores microgliales de tipo general, de fagocitosis, de motilidad y de respuesta inflamatoria tanto de carácter proinflamatorio como antiinflamatorio. Hay que recordar que algo similar se descubrió con los análisis génicos de las células de BMDML, donde se observó una expresión elevada de genes relacionados con los procesos de motilidad y respuesta proinflamatoria. Todo ello indicaría una activación microglial incluso antes del comienzo de los procesos neurodegenerativos ([Vezzani et al., 2013](#); [Fu et al., 2014](#); [Zheng et al., 2016](#); [Franco-Bocanegra et al., 2019](#)).

Asimismo, estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado que existen ciertas alteraciones ultraestructurales y morfológicas en las células de Purkinje ([Baltanás et al., 2011](#); [Muñoz-Castañeda et al., 2018](#); [Pérez-Revuelta, 2023](#)) y en las células mitrales ([Valero et al., 2006](#)) de los ratones PCD incluso antes de su evidente neurodegeneración; es decir, durante la denominada etapa preneurodegenerativa. Nuestros resultados indican que la microglía sería capaz de detectar estos pequeños fallos o variaciones de su entorno. Así, la microglía del ratón PCD se activaría incluso antes del comienzo de la neurodegeneración de las células de Purkinje y de las células mitrales al detectar algún tipo de funcionamiento anómalo en ellas, probablemente con el fin de revertir dicha situación y mantener la homeostasis del sistema. Este hecho tiene una gran relevancia en la clínica, ya que el análisis de la expresión de determinados marcadores microgliales podría servir como un método de diagnóstico temprano, facilitando así el tratamiento de determinadas enfermedades neurodegenerativas ([Henley et al., 2005](#); [Nuzzo et al., 2014](#)). Específicamente, en los estudios inmunohistológicos realizados en el cerebelo y BO antes del comienzo de los procesos neurodegenerativos, no se observan diferencias en cuanto al número, morfología y distribución de la microglía del ratón PCD al compararla con la de los ratones WT en las mismas estructuras nerviosas. Esto pondría de manifiesto que el estudio génico de determinados marcadores microgliales es crucial

Discusión

para la detección temprana de los procesos neurodegenerativos en algunas enfermedades neurodegenerativas. De hecho, se podría pensar que esta activación temprana de la microglía del ratón PCD podría iniciar la muerte de las células de Purkinje o de las células mitrales, como ocurre con otras enfermedades nerviosas, donde el mal funcionamiento de la microglía es un notable desencadenante (Harry, 2021; Xu et al., 2021; Gao et al., 2023).

Para dar respuesta a esta y otras preguntas se inhibió la microglía del cerebelo de los ratones PCD antes del inicio de la muerte de las células de Purkinje. Así se comprobó que, aun eliminando la microglía del cerebelo, las células de Purkinje continuaban muriendo, por lo que la causa principal de su muerte no se debe a la activación temprana de la microglía, sino a otros motivos ya estudiados, aunque una microgliosis exacerbada sí incrementa la degeneración (ver más adelante; Baltanás et al., 2013; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Pérez-Martín et al., 2023).

Durante los procesos de máxima neurodegeneración del cerebelo y BO, se observó una gran expresión de prácticamente todos los genes microgliales analizados. Esto indica una gran activación de la microglía en ambas estructuras nerviosas, probablemente como respuesta a la degeneración de las células de Purkinje y células mitrales (Landis y Mullen, 1978; Wang y Morgan, 2007; Recio et al., 2007; Valero et al., 2007; Muñoz-Castañeda et al., 2018). El aumento de expresión en los genes de tipo general supone tanto un aumento en la actividad como en la proliferación de la microglía. En concreto, los análisis inmunohistoquímicos con Iba1 demostraron un aumento de densidad de microglía tanto en el cerebelo como en el BO de los ratones PCD, al igual que se había observado en investigaciones previas a edades similares (Baltanás et al., 2013; Pérez-Martín et al., 2023). Por su parte, el aumento en los genes relacionados con los procesos de fagocitosis y motilidad demuestra un aumento de ambas funciones. De este modo, al igual que ocurre en diversas patologías neurodegenerativas, la microglía del ratón PCD adquiriría un fenotipo activado y presentaría una mayor motilidad y capacidad fagocítica con el objetivo de desplazarse por el parénquima nervioso hacia las neuronas muertas para fagocitarlas y así eliminarlas del medio circundante y restablecer la homeostasis del sistema (Neher et al., 2012; Butler et al., 2021; Gao et al., 2023). Más aún, como ya se había visto en investigaciones previas del laboratorio (Baltanás et al., 2013), tanto en el cerebelo como en el BO la microglía tiende a desplazarse hacia las capas nerviosas

donde se encuentran las neuronas en degeneración. Esto se hace más evidente en el cerebelo con una clara concentración de la microglía en las capas molecular y de las células de Purkinje (Baltanás et al., 2013; Pérez-Martín et al., 2023). En el BO también se observa una tendencia de desplazamiento hacia la capa de las células mitrales, pero no es tan obvia como en el caso del cerebelo (Baltanás et al., 2013). Este efecto podría deberse a que la degeneración de las células de Purkinje es más rápida y agresiva que la de las células mitrales, lo que provocaría una respuesta microglial más exagerada con el objetivo de paliar los daños lo más rápido posible. Todo ello estaría en consonancia con los resultados *in vitro*, donde se observó que la microglía PCD aislada tanto del cerebelo como del BO presentaba una fagocitosis y motilidad más elevadas que la microglía WT. Así pues, tanto la mutación en el gen *Ccp1*, como un ambiente neural, neurodegenerativo, en este caso, promueve el aumento de ambas funciones microgliales.

Mientras que la morfología microglial observada cualitativamente durante la fase previa a la muerte neuronal fue predominantemente ramificada (en reposo), la correspondiente al periodo de máxima neurodegeneración correspondía a los tipos ameboides e hiperramificados, ambos relacionados con estados de activación microglial (Parakalan et al., 2012; Boche et al., 2013; Vidal-Itriago et al., 2022). Este cambio morfológico debido al daño neuronal ya se había observado en nuestros experimentos *in vitro* (Tabla 14). Precisamente, el aumento en la expresión de genes tales como *Tnf- α* o *Ccl2* reduce la extensión de las ramificaciones celulares (Adrian et al., 2023), lo que favorecería la adquisición de dichas morfologías: la microglía ameboides no presenta ramificaciones y la microglía hiperramificada presenta unas ramificaciones más acortadas. Asimismo, se observó un aumento del área celular, el cual es congruente con el observado en las células de microglía en cultivo aisladas del cerebelo y BO a la misma edad. Investigaciones previas demuestran que el aumento del área celular de la microglía se asocia a un estado de activación en respuesta a un determinado estímulo nocivo (Davis et al., 2017). Todos estos datos indican que la microglía del PCD durante los procesos de neurodegeneración adquiere un estado muy activado o incluso, en el caso del cerebelo, hiperactivado, lo que produce un aumento de su capacidad fagocítica, motilidad y producción de sustancias tanto de carácter proinflamatorio como antiinflamatorio.

Discusión

En consonancia con lo anterior, el aumento de expresión en los genes de respuesta inmunitaria se correspondería con un aumento de la liberación de mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios. Los primeros facilitan la respuesta inflamatoria y desempeñan un papel esencial en los procesos de reparación tras los daños. Sin embargo, su liberación masiva e incontrolada, como parece ser que ocurre en el modelo PCD, podría estar agravando la muerte neuronal tanto de las células de Purkinje como de las mitrales, ocasionando un daño adicional al tejido nervioso circundante (Zheng et al., 2016). Esta hipótesis encaja perfectamente con lo observado en el cerebelo, donde la liberación de mediadores inflamatorios es masiva y mucho más elevada que en el BO, lo que podría dar explicación a que la muerte de las células de Purkinje sea tan repentina y rápida. Más aún, la inhibición de la microglia exacerbada del cerebelo redujo la degeneración de las células de Purkinje, lo que apoya esta explicación (ver más adelante). Por el contrario, en el BO, aunque la expresión de genes de respuesta inflamatoria sea elevada, no lo es tanto como en el caso del cerebelo, lo que explicaría que la degeneración de las células mitrales sea más lenta y prolongada en el tiempo. Si bien, también hay que tener en cuenta que el BO es una región muy plástica, capaz de adaptarse a diversas situaciones anómalas o consideradas como patológicas (Díaz et al., 2017; Pérez-Boyeró et al., 2023). Esta característica podría conferirles una mayor resistencia a los procesos neurodegenerativos haciendo que éstos sean menos acusados (Díaz et al., 2017). Por su parte, el aumento en la expresión de genes antiinflamatorios se correspondería con un hipotético proceso de reparación del tejido para evitar los efectos negativos asociados a una inflamación excesiva (Vezzani et al., 2013). De este modo, los altos niveles de expresión de genes antiinflamatorios en el cerebelo y BO tendrían sentido, ya que se originarían en respuesta a la reacción proinflamatoria elevada, aunque sin llegar a controlarla de una forma efectiva. Además de todo ello, se ha demostrado que una disfunción de los microtúbulos en algunos tipos de células gliales se correlaciona con la generación de procesos neurodegenerativos a causa de una desregulación de la respuesta inmune de dichas células (Cyske et al., 2023). Así, la mutación en el gen *Ccp1* predispondría a la microglia del ratón PCD a generar respuestas inmunitarias desmedidas e incontroladas debidas al posible funcionamiento anómalo de sus microtúbulos. Esta hipótesis encajaría perfectamente con lo discutido en los apartados correspondientes a los experimentos *in vitro* (ver más arriba).

Una vez finalizados los procesos neurodegenerativos primarios, tanto en el cerebelo como en el BO se mantuvo una densidad y distribución microglial similares a las encontradas durante la muerte de las células de Purkinje y de las células mitrales. Es decir, la microglía del PCD continuaba expresando niveles génicos elevados correspondientes a su capacidad fagocítica, motilidad y respuesta inmunitaria. Por lo tanto, se puede considerar que la microglía continúa en un estado activado. Si bien, esta expresión era menor que la producida durante los procesos neurodegenerativos, por lo que la activación no es tan elevada, probablemente debido al cese de la muerte neuronal. Sorprendentemente, este hecho fue más llamativo en el BO: durante el periodo post-degenerativo se mantuvo una expresión al alza de prácticamente todos los genes analizados, aunque con valores menos elevados que durante la fase de degeneración neuronal. Esto pone de manifiesto que la respuesta microglial que se produce en el BO se alarga en el tiempo. Por tanto, se trata de una reacción microglial crónica que podría agravar tanto la muerte de las células mitrales como la de otras poblaciones neuronales. De hecho, en estudios previos sobre el BO de los ratones PCD, además de la muerte de células mitrales, se observa la muerte de algunas interneuronas (Valero et al., 2007). Esta degeneración secundaria podría estar motivada, al menos en parte, por este tipo de reacción microglial cronificada, sin descartar como causa la drástica disminución de dianas sinápticas disponibles como consecuencia de la degeneración de las células mitrales (Recio et al., 2007; Valero et al., 2007). Por otra parte, el hecho de que se siga produciendo un mayor estado de activación en el BO puede deberse a que la degeneración bulbar no haya concluido. Tradicionalmente se considera que a la edad de P110 prácticamente han degenerado todas las células mitrales (Valero et al., 2007). Sin embargo, no hay una edad consenso para el fin de esta degeneración, estableciéndose en otros casos alrededor de P90 o incluso de P120 o más (Greer y Shepherd, 1982; Recio et al., 2011; Díaz et al., 2012). Así pues, a diferencia del cerebelo, en el BO de los ratones PCD a edades avanzadas aún quedan algunas poblaciones de células mitrales supervivientes. Dichas neuronas podrían presentar alguna alteración y/o continuar con su proceso degenerativo a un ritmo mucho más lento, lo que mantendría la activación de la microglía de una forma continuada. De hecho, se observa un fenómeno análogo en el lóbulo X del cerebelo, que presenta una resistencia particular a la degeneración de las células de Purkinje (Hernández-Pérez,

2022; Hernández-Pérez et al., 2023). Por tanto, durante la fase de máxima neurodegeneración de estas neuronas (P25) dicho lóbulo no presenta ningún tipo de alteración. Más adelante, en torno a P30, comienza la degeneración del lóbulo X, observándose la muerte de algunas neuronas. Si bien, aunque con el tiempo la degeneración de este lóbulo acabe por ser total, está claro que tiene un cierto retardo. De este modo, mientras dicha degeneración sigue en curso, se acompaña de una fuerte reacción microglial en torno a las células de Purkinje, retardada y caracterizada por una morfología, densidad y distribución similares a la del resto de los lóbulos cerebelosos a P25. De este modo, sería muy interesante el estudio de la expresión génica de los marcadores microgliales comparando el lóbulo X con el resto de los lóbulos, para observar si la neuroprotección que presenta el primero viene motivada por alguna acción de la microglía, ya que no se debe de olvidar que está en constante comunicación con las neuronas.

La comunicación entre la microglía y las neuronas en el ratón PCD se encuentra comprometida antes, durante y después de los procesos neurodegenerativos

La comunicación entre las neuronas y la microglía está mediada por moléculas que tanto desencadenan la activación microglial como la inhiben (Posfai et al., 2018; Manich et., al 2019). Específicamente, el funcionamiento normal de los ejes de comunicación microglía-neurona se basa en la exhibición por parte de las neuronas de una serie de señales basadas en la secreción de quimiocinas que mantienen a la microglía en un estado de “inhibición” o “vigilancia”. Sin embargo, estos ejes de comunicación se alteran en respuesta a un determinado estímulo patológico: las neuronas eliminan su control inhibitorio sobre la microglía, lo que hace que ésta lo interprete como una amenaza o señal de peligro, activando así la respuesta inmunitaria (Szepesi et al., 2018). Así, la comunicación normal entre la microglía y las neuronas contribuye al fenotipo fisiológico de la microglía, manteniéndola en un estado de vigilancia constante para responder adecuadamente a los acontecimientos que se producen en su entorno. Por tanto, es muy probable que los fallos en esas interacciones contribuyan de forma significativa a cualquier proceso neurodegenerativo (Harry, 2021).

Específicamente, en el ratón PCD se han observado alteraciones en la expresión de los genes que constituyen algunos de los ejes más conocidos de comunicación microglía-neurona. Estas alteraciones se han observado a todas las edades analizadas, especialmente durante los procesos de máxima degeneración del cerebelo y del BO. Por tanto, la desestabilización de los ejes microglía-neurona sería un indicativo claro de la activación de la microglía del ratón PCD debido a una situación anómala o patológica. La alteración de estos ejes se produjo incluso antes del comienzo evidente de la degeneración de las células de Purkinje y de las células mitrales, por lo que este hecho vuelve a hacer evidente que tanto los cambios en la microglía como en sus sistemas de comunicación con las neuronas podrían utilizarse como un indicador de inicio temprano en una serie de enfermedades neurodegenerativas (Henley et al., 2005; Nuzzo et al., 2014). Además, se observó que la desregulación de la comunicación entre la microglía y las neuronas era mayor en el cerebelo que en el BO, ya que en el primero se encontraron más alterados los ejes de comunicación. Específicamente, antes del comienzo de los procesos neurodegenerativos en el cerebelo se encontraban dos ejes alterados, mientras que en el BO sólo uno. Durante las etapas de máxima neurodegeneración, en el cerebelo se encontraron los tres ejes alterados, mientras que en el BO sólo dos de ellos. Únicamente al finalizar los procesos neurodegenerativos, se encontraron resultados similares en el cerebelo y BO, con los tres ejes alterados. Por lo tanto, queda claro que los ejes microglía-neurona, aun cuando han finalizado los procesos neurodegenerativos, se encuentran alterados.

En el caso del cerebelo, los tres ejes estudiados están afectados desde el inicio de los procesos degenerativos. Por su parte, en el BO, sólo cuando finaliza la muerte de las células mitrales es cuando se observan alterados todos los ejes estudiados. Este hecho podría deberse a la diferencia que hay entre ambas regiones en los procesos tanto de muerte neuronal como de neuroinflamación: en el cerebelo ocurren de una forma muy rápida y exacerbada, mientras que en el BO ocurren de una forma más lenta y progresiva en el tiempo. Por lo tanto, la diferente afectación en los ejes microglía neurona podría explicar, en parte, el por qué los procesos neurodegenerativos son más agresivos en el cerebelo que en el caso del BO.

Discusión

Si bien, en nuestro estudio, de todos los ejes de comunicación que existen, nosotros sólo nos centramos en tres, por lo que para realmente estudiar la completa interacción de la microglía con las neuronas sería necesario estudiar más ejes.

En resumen: a mayor daño neuronal, mayor desregulación y respuesta microglial. De hecho, como ya se ha comentado a lo largo de este escrito, una desregulación de estos ejes se encuentra implicada en procesos de quimiotaxis y proliferación microglial. En parte, esto explicaría lo observado en ambos escenarios nerviosos durante los procesos de máxima neurodegeneración: en el cerebelo una gran proliferación de la microglía y un desplazamiento muy evidente hacia las células de Purkinje en degeneración; en el BO una proliferación moderada de la microglía y un desplazamiento no tan evidente hacia las células mitrales en degeneración. Por tanto, la mayor alteración de los ejes en el cerebelo frente al BO se debería a la rápida y abrupta degeneración de las células de Purkinje del primero, lo que haría que se produjera un contexto degenerativo de mayor gravedad que en el caso del BO. Así pues, el estudio de las vías de comunicación de la microglía con las neuronas podría ser utilizado como un indicador de la gravedad de una patología nerviosa, además de un marcador temprano de la misma. De este modo, la modulación de las vías de comunicación microglía-neurona podría ser considerada como un nuevo enfoque terapéutico en gran multitud de patologías nerviosas.

La administración de PLX5622 produce una mayor supervivencia de las células de Purkinje y una mejora en las habilidades motoras de los ratones PCD

Una vez demostrada la notable alteración de la microglía de los ratones PCD tanto en escenarios *in vitro* como en escenarios *in vivo*, se quiso demostrar de una forma definitiva si la microgliosis podía ser una causa o simplemente la consecuencia de los procesos neurodegenerativos en dicho modelo animal. Este último estudio se centró solamente en el cerebelo por ser la región nerviosa donde se producen los procesos neurodegenerativos más agresivos y evidentes, y, por lo tanto, donde se produce una mayor microgliosis. En estudios previos del laboratorio en los que se han utilizado estrategias neuroprotectoras se ha presupuesto que la microgliosis exacerbada aumentaba el daño neuronal ya que con dichas estrategias la microgliosis se veía

reducida (Díaz et al., 2012; Pérez-Martín et al., 2023). Sin embargo, esta reducción de la microgliosis con agentes neuroprotectores podría ser un efecto secundario debido a la reducción de la muerte neuronal. Así pues, para saber definitivamente si la microgliosis del ratón PCD incrementa la muerte de las células de Purkinje, se eliminó la microglía del cerebelo antes del comienzo de la degeneración de estas neuronas. Para ello se eligió el PLX5622 por ser una sustancia muy eficaz y rápida a la hora de inhibir la microglía de una forma casi completa (Spangenberg et al., 2019; Riquier et al., 2020; Basilico et al., 2022).

Tras la administración de este inhibidor se halló una mayor densidad de células de Purkinje, así como una mayor área de ocupación de su árbol dendrítico en el cerebelo de los ratones PCD. Por lo tanto, al eliminar la microglía, se favorece la supervivencia de las células de Purkinje, demostrándose así que, a pesar de que la microgliosis exacerbada del cerebelo no es la causante primaria y directa de la muerte de las células de Purkinje, sí favorece su pérdida. En algunas patologías del SNC, como en las lesiones cerebrales debidas a un trauma, se ha observado que la inhibición de la microglía reduce la neurodegeneración de la zona afectada debido a la eliminación de la inflamación desmedida que se produce tras el golpe (Henry et al., 2020; Li et al., 2020). Posiblemente ocurra lo mismo en el modelo PCD: al eliminar su microglía se reduciría el estado inflamatorio exacerbado del cerebelo. Existen estudios previos donde se realizó un tratamiento menos agresivo y específico en ratones PCD con resultados comparables: en este caso, se usó minociclina, un atenuante de la microglía de tipo proinflamatorio con efecto adicional sobre las neuronas (Kyuhou et al., 2006). En este trabajo se indicó una cierta mejora en la muerte neuronal y en la coordinación motora de los ratones afectados, sugiriendo que la inflamación acelera la degeneración de las células de Purkinje en los ratones PCD (Kyuhou et al., 2006), lo que apoya nuestros datos. De hecho, además de observar una mayor supervivencia de las células de Purkinje, al administrar el fármaco PLX5622 se hallaron mejoras en la ataxia cerebelosa de los ratones PCD. Estas mejoras se han visto en otros modelos de patología nerviosa, como en las lesiones cerebrales debidas a un trauma, en las que se demostró que, al eliminar la microglía, los ratones mejoraban sus capacidades motoras tras el proceso patológico (Henry et al., 2020; Witcher et al., 2021). Probablemente esta mejora se deba a la mayor supervivencia de las células de Purkinje. En todo caso, para confirmar si la mejora en el

Discusión

comportamiento motor se produce por la mayor supervivencia de estas neuronas, sería necesario analizar su actividad sináptica (Sekirnjak et al., 2003) o electrofisiológica (Cheron et al., 2022).

Hay explicaciones adicionales que apoyan los beneficios de la eliminación de la microglía en nuestro modelo. Así, investigaciones previas demuestran que las células de microglía promueven la muerte de neuronas en desarrollo que no establecen conexiones adecuadas durante su sinaptogénesis (Marín-Teva et al., 2004). Las señales que median esta actividad son los ejes microglía-neurona. De este modo, la microglía del PCD podría fomentar la eliminación de células de Purkinje, incluso con una sinaptología correcta, por el mero hecho de tener alterados sus ejes de comunicación, empeorando así la patología cerebelosa. Más aún, nuestros resultados *in vitro* demuestran que la microglía del PCD presenta una mayor capacidad fagocítica una vez ha estado en contacto con un ambiente neuronal.

Otros estudios relacionados con la inflamación crónica por envejecimiento han demostrado que la eliminación de la microglía reduce la muerte neuronal asociada a dicha inflamación. Esto se debe a la menor producción de mediadores proinflamatorios por parte de la microglía, así como a una menor activación y reactividad astrocitaria (Park et al., 2021; Stojiljkovic et al., 2022). En base a los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral y a investigaciones previas, se puede concluir que en el ratón PCD existe una gran producción de mediadores inflamatorios y una gran reactividad astrocitaria durante los procesos neurodegenerativos (Baltanás et al., 2013; Pérez-Martín et al., 2023). Así pues, probablemente tras la eliminación de la microglía en el cerebelo del ratón PCD, además de reducirse la producción de mediadores inflamatorios producidos por la microglía, también se disminuya la reactividad astrocitaria que se observa durante los periodos de máxima neurodegeneración cerebelosa (Baltanás et al., 2013). Sería muy interesante comprobar esta variable en un futuro.

Aunque en el modelo PCD la eliminación de la microglía del cerebelo produce efectos beneficiosos, en otras patologías nerviosas se han observado efectos perjudiciales tras dicha eliminación. Específicamente, en estudios sobre la enfermedad de Párkinson se ha demostrado que la eliminación de la microglía agrava las alteraciones en la coordinación motora debido a que la microglía, en estos casos, desempeña una función protectora y favorece la supervivencia de las neuronas dopaminérgicas durante la

enfermedad (Yang et al., 2018; Pereira et al., 2023). Por tanto, el efecto tanto en la supervivencia neuronal como en las mejoras motoras probablemente dependa del tipo de patología nerviosa y de la función que la microglía realice en el transcurso de la enfermedad. Dado que la reacción glial también se produce en el BO (Baltanás et al., 2013), otro estudio pertinente sería eliminar la microglía del BO de los ratones PCD durante la muerte de las células mitrales ya que, como se ha comentado anteriormente, los efectos de esta eliminación dependen de la patología y zona afectada, siendo en unos casos beneficiosos (Henry et al., 2020; Witcher et al., 2021) y en otros casos perjudiciales (Yang et al., 2018; Pereira et al., 2023). De esta manera, se comprobaría qué efectos produce la eliminación de la microglía en una región donde el contexto neurodegenerativo y neuroinflamatorio es más moderado y progresivo que en el caso del cerebelo.

Se necesitan estudios más detallados acerca del uso del inhibidor de la microglía tanto en las distintas regiones nerviosas como en las distintas enfermedades neurodegenerativas. El inhibidor PLX5622 no sólo presenta una gran eficacia a la hora de eliminar la microglía, sino que, de una forma indirecta, puede utilizarse como un fármaco terapéutico en diversos estudios preclínicos de una gran cantidad de patologías relacionadas con el sistema nervioso debido a su uso sencillo, su fácil administración y su gran eficacia. Pero este tipo de inhibidor presenta algunas limitaciones o inconvenientes. Por ejemplo, su administración no es específica, por lo que no se dirige a una región encefálica determinada. Asimismo, su administración produce efectos fuera del SNC afectando a otros tipos celulares como los monocitos o a algunas poblaciones de células mieloides y linfoides periféricas causando cambios irreversibles en la composición de la médula ósea, del bazo y de la sangre (Lei et al., 2020; Basílico et al., 2022). Por todo ello, se hace necesario el uso de inhibidores microgliales que sean más selectivos, es decir, que puedan dirigirse sólo a la microglía considerada como patológica al comprometer la supervivencia neuronal y, por ende, la homeostasis del sistema.

En resumen, en nuestro modelo de estudio se demuestra por primera vez que la activación exacerbada de la microglía del cerebelo de los ratones PCD acentúa la rápida pérdida de las células de Purkinje. Así pues, el ambiente inflamatorio desmedido de este modelo animal presenta un efecto deletéreo sobre la supervivencia neuronal. Por tanto,

Discusión

queda muy claro que la modulación o, incluso, la inhibición de la microglía es un punto clave muy para tener en cuenta para el tratamiento de determinadas patologías nerviosas.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral, y a tenor de los resultados obtenidos y de su discusión exponemos las siguientes conclusiones:

- I. Sin la influencia del ambiente neural -fisiológico o patológico- la microglía de tipo PCD presenta una fagocitosis muy reducida y una motilidad y proliferación elevadas. **El gen *Ccp1* per se interviene en el funcionamiento normal de la microglía.**
- II. El ambiente neural fisiológico influye en algunas características de la microglía del PCD: aumenta su capacidad fagocítica y disminuye su proliferación. **El ambiente neural es determinante per se para cambiar –incluso revertir– algunas funciones de la microglía con el gen *Ccp1* alterado.**
- III. Un ambiente patológico altera aún más la microglía de tipo PCD: vuelve a proliferar en gran medida, adopta forma más ameboide e hiperramificada, e incrementa notablemente la expresión de Iba1. **Un ambiente patológico es preciso para que la microglía con el gen *Ccp1* alterado adquiera una activación efectiva.**
- IV. Los resultados *in vivo* corroboran los obtenidos *in vitro*: durante la máxima degeneración del PCD hay una elevada expresión génica y proteica de marcadores de activación microglial (pro- y antiinflamatorios), y una alteración de la comunicación de la microglía con las neuronas, especialmente en el cerebelo. **El ambiente patológico predispone de un modo proporcional a su gravedad a que la microglía adquiera un fenotipo determinado de activación inmunitaria.**
- V. El cambio en la biología de la microglía es muy patente en el cerebelo del ratón PCD, pero se atenúa con rapidez. En el BO dicha alteración es más moderada, pero se mantiene con el tiempo. **La biología de la microglía y el grado de neurodegeneración -intensidad y duración- van de la mano.**
- VI. La depleción de la microglía con PLX5622 mejora la supervivencia de las células de Purkinje y la habilidad motora del ratón PCD. **Una microgliosis exacerbada agrava la pérdida de las células de Purkinje, lo que acentúa la ataxia cerebelosa.**

ENGLISH SUMMARY

INTRODUCTION

Neurodegenerative disorders are a growing problem in an increasingly aging society. These pathologies involve generalized neuronal death that affects movement, cognition and/or affectivity, among other functions (Wes et al., 2016). Along with neuronal loss, an activation of the immune system is triggered, which generates inflammation that, if excessive, can aggravate the primary neuronal loss. Thus, the study of the immune response in the central nervous system (CNS) and the involvement of microglia in the phenomena of neurodegeneration and neuroinflammation is a major challenge for current neuroscience (Wes et al., 2016).

Microglia is a cell type of the CNS that in mammals constitutes approximately 10-15% of all its cells (Xavier et al., 2014; Warden et al., 2023). Although microglial cells are considered immune-like cells, they present a unique identity that makes them distinguishable from macrophages or monocytes due to their early and perennial exposure to a particular nervous environment. In a normal physiological state, microglia present a "resting" or "surveillance" morphology with a branched appearance. In contrast, under pathological conditions, microglia change their morphology towards a more amoeboid morphology being considered as their "activated" state (Baltanás et al., 2013; Mantovani et al., 2013; Du et al., 2017). In every possible state in which they can be found, microglia cells perform many important functions, from the embryonic stage to the adult, which make it possible for the CNS to function properly. In particular, the immune function stands out, because microglia act as a defensive agent against substances or organisms considered as pathogens. So much so that microglia are commonly referred as the immune system of the CNS (Stansley et al., 2012; Wolf et al., 2017). However, apart from its immunological function, microglia are responsible for performing other functions to maintain the homeostasis of CNS by participating in synaptic pruning (Hong et al., 2016), formation of dendritic spines (Nebeling et al., 2023), myelination of axons (McNamara et al., 2023), vasculogenesis, neurogenesis and astrogenesis, among other processes (Stansley et al., 2012; Al-Onaizi et al., 2020). Although there are numerous studies dealing with microglia and their functions, more detailed analyses are still needed to elucidate the mechanisms of activation and signaling of this cell type in neurodegenerative processes.

English summary

Currently, there are different animal models used for studying the neurodegenerative and neuroinflammatory processes that occur in different nervous pathologies. Specifically, in this Doctoral Thesis we have used an animal model of selective neurodegeneration and neuroinflammation denominated PCD (Purkinje Cell Degeneration) mutant mouse.

The PCD mouse has a mutation in the *Ccp1* gene that codes for the CCP1 enzyme. This enzyme is responsible for performing post-translational modifications of microtubules by removing glutamic acid residues from the C-terminal end of tubulins (Kalinina et al., 2007; Rogowski et al., 2010; Berezniuk et al., 2012; Muñoz-Castañeda et al., 2018). Therefore, the absence of the CCP1 glutamylase activity alters the structure and dynamics of microtubules, as they become hyperglutamidated (Rogowski et al., 2010; Muñoz-Castañeda et al., 2018; Pang et al., 2023). In addition, CCP1 enzyme is responsible for providing chromosome stability (Baltanás et al., 2011), maintaining nucleolus structure and organization (Baltanás et al., 2019), maintaining mitochondrial dynamics and energy metabolism (Gilmore-Hall et al., 2019), as well as participating in fusion (Gilmore-Hall et al., 2019) and cell differentiation processes (Ye et al., 2018). Due to the absence of *Ccp1* expression, the PCD mouse shows a postnatal degeneration of the Purkinje cells of the cerebellum and the mitral cells of the olfactory bulb (OB). Purkinje cell degeneration is the earliest and fastest, and the first to be discovered; therefore, it is the one for which the model is named. This degeneration takes place between the third and fourth week of life, with the peak of maximum neurodegeneration occurring around postnatal age (P25), so that by P40 almost all these neurons have died (Landis and Mullen, 1978). This causes severe cerebellar ataxia, which is the most striking phenotypic feature of PCD mice (Landis and Mullen, 1978). Later, the degeneration of mitral cells of the BO occurs between the second and fourth month of postnatal life, with the peak of maximum neurodegeneration occurring around P70, and concluding around P110 (Greer and Shepherd, 1982; Valero et al., 2006). This phenomenon leads to the development of hyposmia, which is characterized by a decreased capacity for olfactory detection and discrimination (Diaz et al., 2012). Along with this neuronal loss, microgliosis is triggered, being very exacerbated and rapid in the cerebellum, while in the BO it is more moderate (Baltanás et al., 2013). Therefore, the PCD mouse brings together in the same animal two scenarios for the study of

inflammation and, therefore, microgliosis. In addition, the *Ccp1* gene is expressed in immune cells, such as microglial cells, but the isolated effect of its mutation is practically unknown. For all these reasons, the PCD mouse can be considered an excellent model for analyzing the microglial response.

HYPOTHESIS AND OBJECTIVES

As mentioned in the previous section, this Doctoral Thesis proposes the use of the PCD mouse as a model of inflammation in face of selective neuronal loss. This animal presents a postnatal degeneration of the Purkinje cells of the cerebellum and the mitral cells of the OB due to the absence of *Ccp1* gene expression. This neuronal death produces two distinct neuropathological contexts with different intensity, in differentiated temporal windows and located in distal regions of the brain. Therefore, the PCD mouse combines in the same animal two models for the study of inflammation and, therefore, microgliosis. Specifically, in the cerebellum an exacerbated and rapid microgliosis takes place, while in the OB there is a more moderate microgliosis spaced over time. It should be remembered that the *Ccp1* gene is expressed in immune cells, such as microglia, but the isolated effect of its mutation is practically unknown. Then, the PCD mouse can be considered an excellent model for analyzing the microglial response.

For these reasons and after the bibliographic review carried out in the Introduction section, the following hypothesis is proposed: **"the biology of microglia is directly related to the neuronal damage that occurs in the PCD mouse"**.

To answer this hypothesis, the following objectives were developed:

- I. To analyze *in vitro* the effect of *Ccp1* expression on the physiological state of microglia without direct neural influence. **Bone marrow-derived microglia.**
- II. To analyze *in vitro* the effect of *Ccp1* expression on the physiological state of microglia without direct influence of neurodegeneration. **Microglia isolated from the cerebral cortex.**
- III. To analyze *in vitro* the effect of *Ccp1* expression on the pathological state of microglia under the neurodegenerative environment of PCD mouse. **Microglia isolated from the cerebellum and from the OB.**

- IV. To analyze *in vivo* the effect of the neurodegenerative environment of PCD mouse on microglia's biology. ***In situ* study of microglia in the cerebellum and OB.**
- V. To analyze *in vivo* the effect of microglia on the neurodegenerative process of PCD mouse. **Microglia inhibitor PLX5622 in PCD cerebellar neurodegeneration.**

MATERIAL AND METHODS

Both wild-type (WT) and PCD mice from the C57BL/DBA hybrid strain were used. The mice were obtained by mating C57BL/6J and DBA/2J strains, both originally purchased from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). As PCD mice are not suitable for breeding (Wang and Morgan, 2007), the colony was kept by mating heterozygous animals which are indistinguishable from their WT littermates. Consequently, the offspring were genotyped by PCR as previously described (Díaz et al., 2012). All animals were handled in compliance with current European (Directive 2010/63/EU and Recommendation 2007/526/EC) and Spanish (RD118/2021 and Law 32/2007) regulations, with the corresponding approval of the Bioethics Committee of the University of Salamanca (reference #00613).

All the experiments carried out in this Doctoral Thesis were classified into *in vitro* and *in vivo* studies (Table 1).

TABLE 1. Experiments conducted to study microglia of PCD mice, both *in vitro* and *in vivo* conditions, and their goals.

TYPE OF EXPERIMENTS					
IN VITRO			IN VIVO		
Bone marrow-derived microglia	Cytometric analysis	To analyse <i>in vitro</i> the effect of <i>Ccp1</i> expression on the physiological state of microglia (without the influence of a neuronal environment).	Microglia of the cerebellum and OB	Gene analysis	To analyse <i>in vivo</i> the effect of the neurodegenerative environment of PCD on the physiological state of microglia.
	Gene analysis				
	Immunocytochemical analysis				
	Phagocytosis analysis				
	Motility analysis				
Proliferation analysis	Immunocytochemical analysis				
Microglia isolated from the cortex	Immunocytochemical analysis	To analyse <i>in vitro</i> the effect of <i>Ccp1</i> expression on the physiological state of microglia (influenced by a neuronal environment).	Microglia-neuron interaction	Gene analysis	Analysing <i>in vivo</i> microglia-neuron interactions
	Phagocytosis analysis				
	Motility analysis				
	Proliferation analysis				
Microglia isolated from the cerebellum and OB	Immunocytochemical analysis	To analyse <i>in vitro</i> the effect of the neurodegenerative environment of PCD on the functioning of microglia.	Administration of the microglial inhibitor PLX5622	Motor performance tests	Eliminate microglia <i>in vivo</i> and observe their effects on neurodegenerative processes in the PCD mouse.
	Phagocytosis analysis			Immunocytochemical analysis	
	Motility analysis				

The *in vitro* studies aimed at understanding both the function of the *Ccp1* gene and the effect of the neural environment (healthy or diseased) on the normal function of microglia. For this purpose, the following cultures were used, and the following experiments were performed (**Table 1**):

- 1. BMDML.** These cells were first characterized by flow cytometry using the general microglial markers Iba1, Tmem119, CD45 and CD11b. This was followed by quantitative PCR (qPCR) genetic analysis of markers of general microglia (*Iba1*, *Cx3cr1*, *Tmem119*), phagocytosis (*Trem2*, *P2ry6*, *Cd68*), motility (*Ccl2*, *Ccr2*) and immune response, both innate (*Tlr2*, *Tlr4*), proinflammatory (*Inos*, *Tnf- α* , *Il-1 β*) and anti-inflammatory (*Arg1*, *Cd206*). In addition, the gene analysis was followed by immunocytochemical studies of morphology (with the marker Iba1), phagocytic capacity (with fluorescent microspheres), motility (using a time-lapse microscope) and cell proliferation (with the marker Ki67 and *alamarBlue*).
- 2. Microglial cells isolated from the cerebral cortex of neonatal mice.** For the study of these cells, immunocytochemical analyses of morphology (with the marker Iba1), phagocytic capacity (with fluorescent microspheres), motility (with a time-lapse microscope) and cell proliferation (with the marker Ki67 and *alamarBlue*) were performed.
- 3. Microglial cells isolated from cerebellum and BO.** For their characterization, immunocytochemical analyses of morphology (with the marker Iba1), phagocytic

English summary

capacity (with neuronal debris) and motility (with a time-lapse microscope) were performed on microglial cells isolated from both cerebellum and OB.

The *in vivo* experiments aimed at analyzing microglia directly in the context of neurodegeneration, to study their relationship with neurons and to observe their role in the development of the neurodegenerative process after pharmacological inactivation. For this purpose, the following experiments were performed (**Table 1**):

- 1. Study of microglia in the cerebellum and OB of PCD mice** before, during and after Purkinje cell (P15, P25 and P40) and mitral cell death (P40, P70 and P120). For this purpose, different analyses of genes were performed, corresponding to general markers of microglia (*Iba1*, *Cx3cr1*, *Tmem119*), phagocytosis (*Trem2*, *Dap12*, *P2ry6*, *Cd68*), motility (*Ccl2*, *Ccr2*), and immune response, both innate (*Tlr2*, *Tlr4*, *Cd200r*), pro-inflammatory (*Inos*, *Tnf- α* , *Il-1 β*) and anti-inflammatory (*Arg1*, *Cd206*). In addition, immunohistological analyses were performed with markers of general microglia (Iba1), reactive microglia (CD45), proinflammatory microglia (CD16/32), and anti-inflammatory microglia (CD206).
- 2. Analysis of microglia communication with neurons in the PCD mouse** in both cerebellum and OB before, during and after neurodegenerative processes. These analyses were performed by qPCR to determine the level of expression of genes related to microglia-neuron communication. Specifically, the microglia-neuron *Cx3cr1-Cx3cl1*, *Ccr2-Ccl2* and *Cd200r-Cd200* axes were analyzed.
- 3. Administration of the PLX5622 microglial inhibitor** to analyze a possible effect of the absence of microglia on the degeneration of Purkinje cells in the cerebellum of PCD mice. The drug was administered every 72 h at a dose of 50 mg/kg starting at age P15, until P24. During its administration, a series of motor behavioral tests (using the rotarod test) were performed to observe whether the elimination of microglia promoted an improvement in the motor skills of PCD mice. In addition, after sacrifice of the mice at P25, immunohistochemical analyses were performed to test the effect of treatment on microglia (using the marker Iba1) and on the survival of Purkinje cells (using the marker Calbindin) in PCD mice.

RESULTS

To ease their comprehension, the summary of results of this Doctoral Thesis is divided into two distinct blocks, corresponding to *in vitro* and *in vivo* experiments. It is necessary to note that, as this document is a summary of the original memory of this Doctoral Thesis, only some of the most representative figures have been included.

In vitro experiments

Bone marrow-derived microglial cells

Flow cytometric analysis showed that virtually all bone marrow cells from mice of both genotypes differentiated into BMDML, but their level of differentiation was different when comparing the two experimental groups: PCD-type BMDML showed a lower percentage of co-expression of the markers Iba1 and Tmem119 compared to WT cells. However, similar values were found for the co-expression of CD45 and CD11b markers between both experimental groups.

Gene analyses showed that cells from WT animals had a higher expression of genes related to general microglial markers (*Iba1*, *Cx3cr1*, *Tmem119*), phagocytic activity (*Trem2*, *P2ry6*) and anti-inflammatory immune response (*Cd206*). In contrast, those genes related to motility (*Ccl2*) and proinflammatory immune response (*Tnf- α* , *Il-1 β*) were higher expressed in PCD-type cells. In the case of the innate immune response genes (*Tlr2*, *Tlr4*), no differences were appreciated between the two genotypes.

Concerning the **immunocytochemical studies**, the Iba1 marker was used to analyze the morphology, the area projected by the volume of the cell soma in a monolayer culture and the expression levels of this marker in the BMDML of both experimental groups. Starting with the morphological study, similar morphologies were observed between both experimental groups: amoeboid, with one branching, two branching and three or more branching. No significant differences were found when comparing the frequencies of these morphologies amongst genotypes, the branched cells being the most frequent. When the area of each cell was analyzed, both genotypes reported similar values. Conversely, regarding the relative expression levels of Iba1, a higher intensity of was found in WT cells (**Fig. 1**).

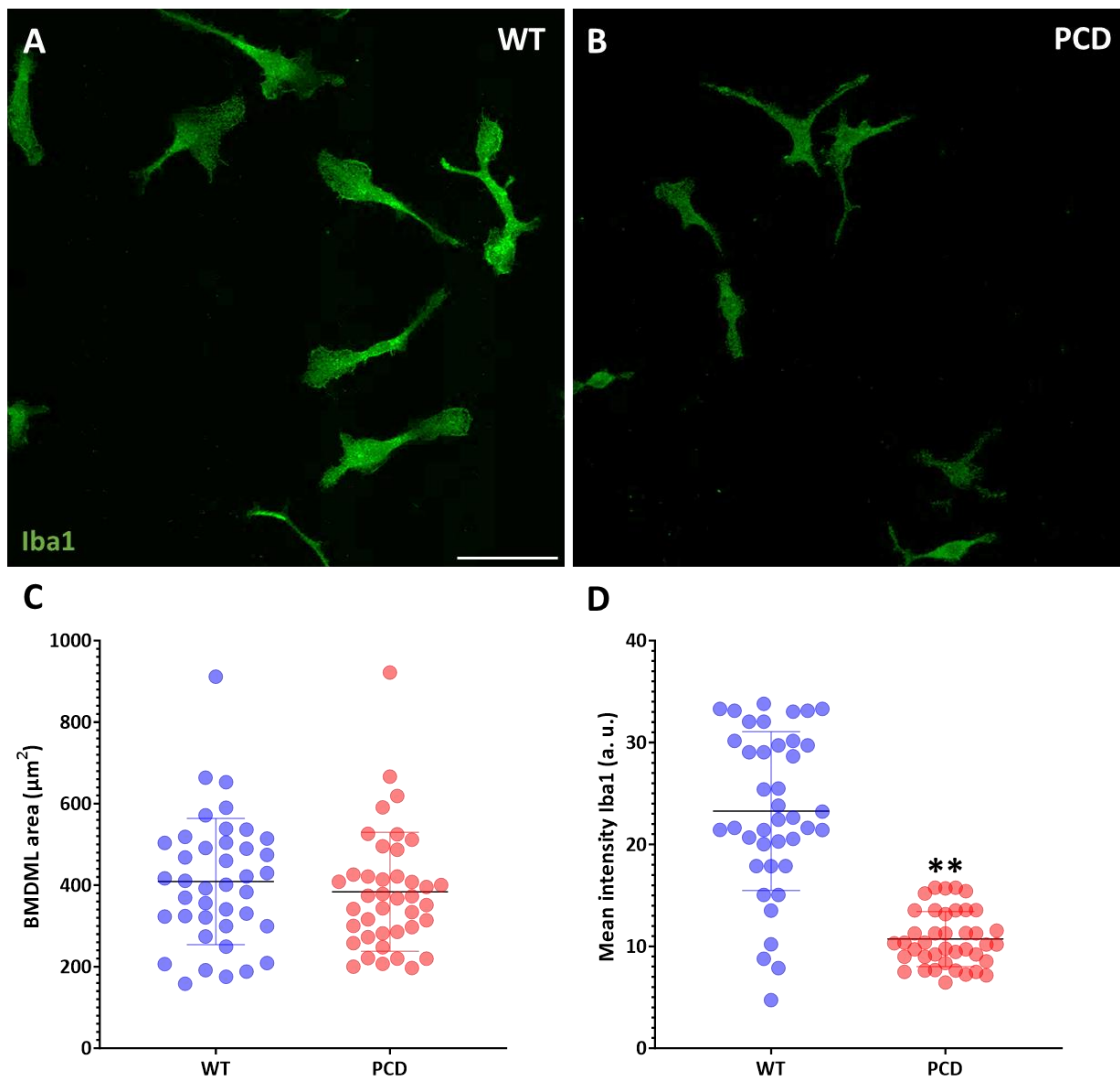


FIGURE 1. Analyses of cell area and Iba1 intensity in BMDML cells. **(A, B)** Images of WT and PCD-type BMDML cells labeled with Iba1 antibody (green). **(C)** The area of WT cells was like the area of PCD cells. **(D)** Higher intensity of Iba1 staining was observed in WT BMDML cells compared to PCD cells. Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to a cell, the central black line to the mean and the error bars to the SD. $**p < 0,01$. Scale bar 50 μm .

When analyzing the **phagocytic capacity** of BMDMLs, it was observed that WT-type BMDMLs phagocytosed a greater number of microspheres than PCD cells, regardless of their cell size.

The **motility study** of BMDMLs showed that WT cells exhibited significantly less motility than mutants did.

The **proliferation studies** performed with both the Ki67 antibody and the *AlamarBlue* compound showed that PCD-type BMDML had greater proliferation than WT cells.

Microglial cells isolated from cerebral cortex

Immunocytochemical analyses of microglial cells isolated from the cerebral cortex of WT and PCD mice were performed to determine the morphology, occupied area, and expression levels of the microglial marker Iba1. As in the previous culture type, similar morphologies and their frequencies were observed in both experimental groups. Once more, the branched phenotypes were predominant. Regarding the area of microglial cells isolated from the cerebral cortex, it appeared similar between both experimental groups. Conversely, statistical differences were found for the intensity of expression of the Iba1 marker, being higher in cells from WT mice (**Fig. 2**).

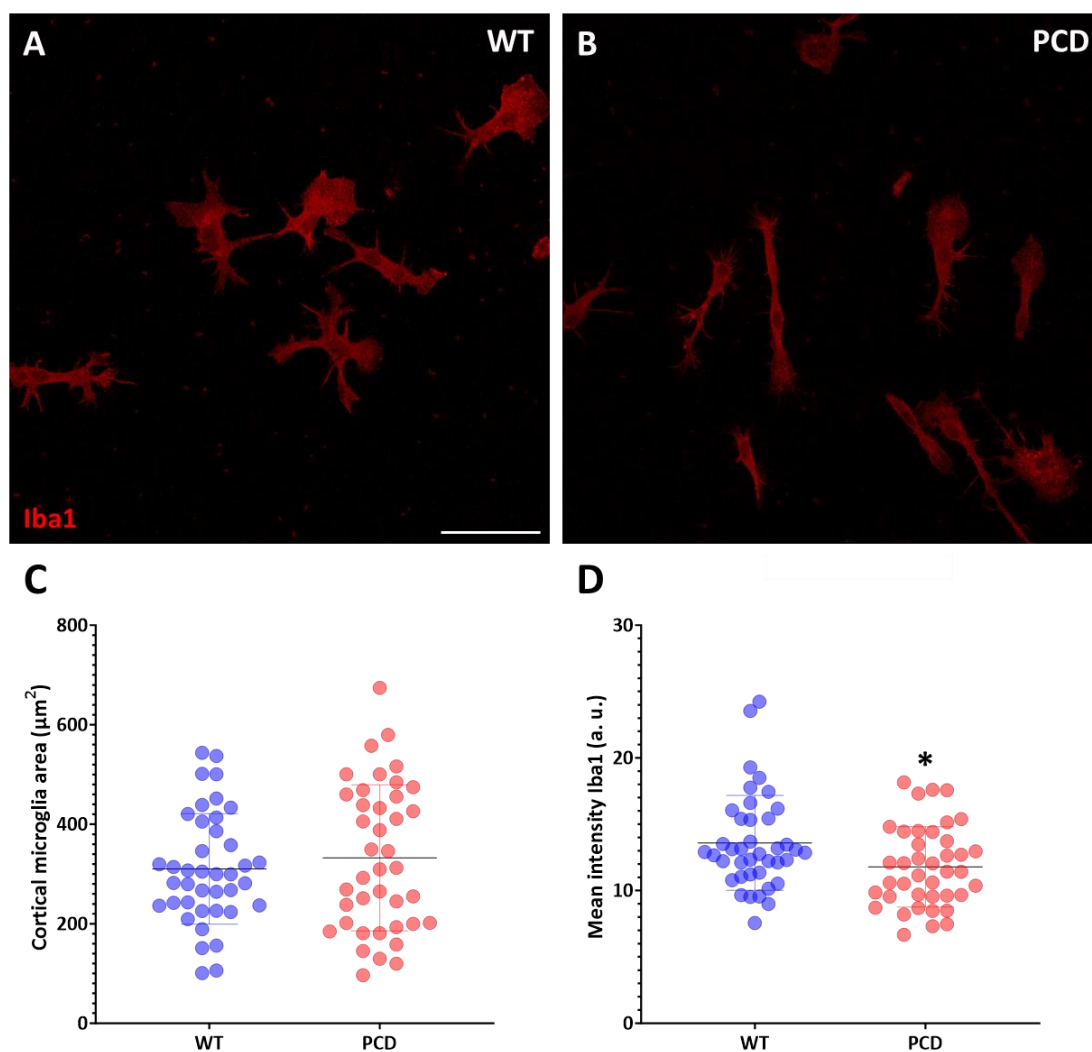


FIGURE 2. Analyses of cell area and Iba1 intensity in microglial cells isolated from the cerebral cortex. **(A, B)** Images of microglial cells of neonatal WT and PCD mice labeled with Iba1 antibody (red). **(C)** The area of WT cells was like that corresponding to PCD cell. **(D)** Iba1 expression intensity was higher in WT cells. Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to a cell, the central black line to the mean and the error bars to the SD. * $p < 0,05$. Scale bar 50 μm .

English summary

Concerning the **phagocytic capacity** of microglia isolated from the cerebral cortex of neonatal mice, PCD microglia were found to phagocytose significantly more fluorescent microspheres than WT cells, irrespectively of their cell size.

Regarding **motility analysis**, WT cortical cells showed lower capacity of movement than PCD cells.

Finally, **proliferation studies** showed that WT and PCD cortical cells presented approximately the same levels of proliferation, with no plausible significant differences between the two experimental groups.

Microglial cells isolated from the cerebellum and olfactory bulb

Immunocytochemical analyses were performed to study the morphology, cell area and expression levels of the Iba1 marker in microglia isolated from both the cerebellum and OB of adult WT and PCD mice at ages of degeneration (P25 and P70, respectively). Morphological studies showed in both regions an increase in the frequency of amoeboid microglia and a decrease in the frequency of cells with one or two branching in PCD-type cultures compared to WT ones. Conversely, no differences were found between both experimental groups in the number of cells with morphology of three or more branching. Regarding the area of microglia, both PCD-type cells derived from both cerebellum (**Fig. 3**) and OB (**Fig. 4**) presented a significant larger size compared to WT counterparts. Finally, when analyzing the intensity of Iba1 expression, significantly stronger labeling was found in PCD microglial cells derived from both cerebellum (**Fig. 3**) and OB (**Fig. 4**).

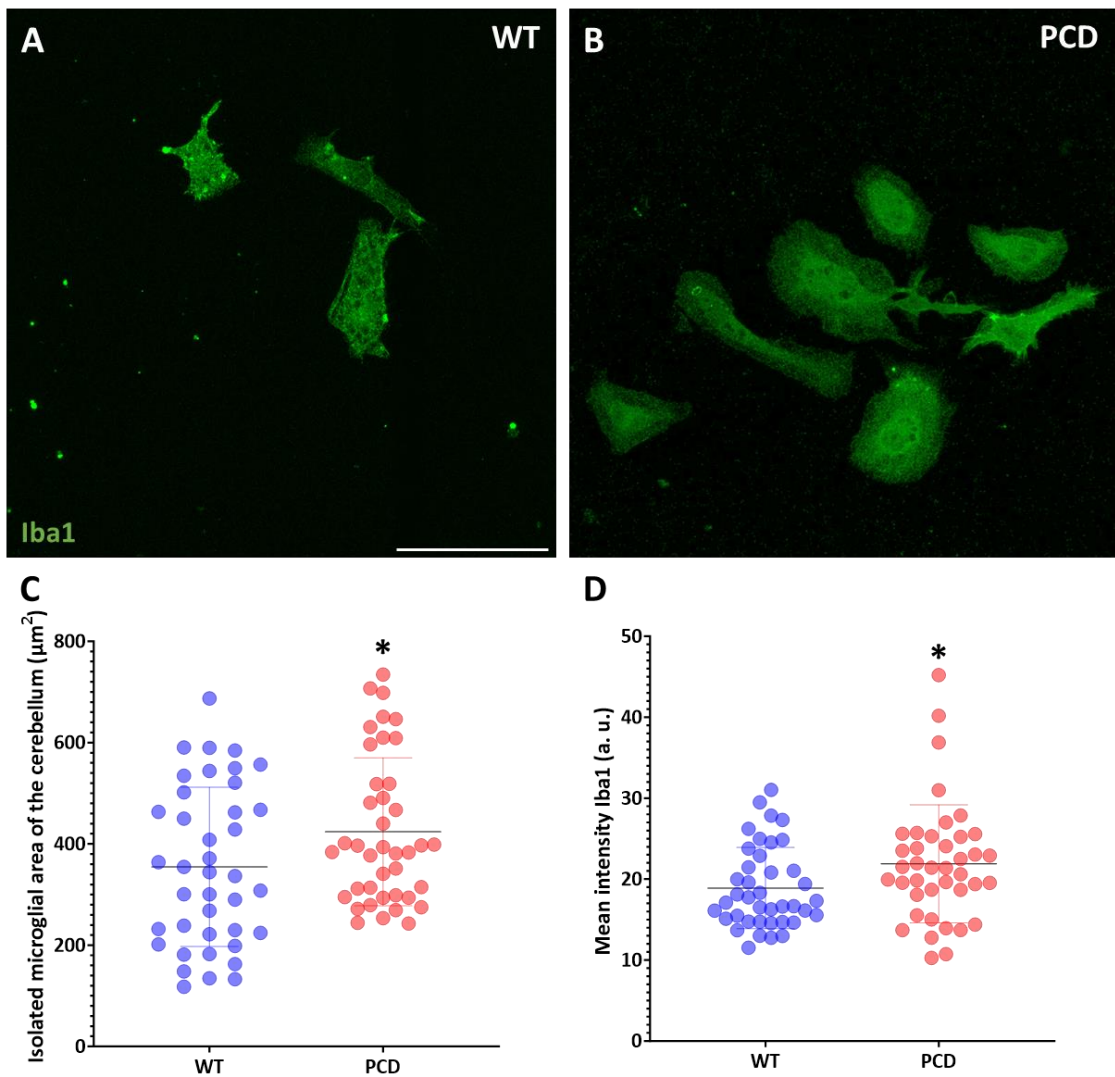


FIGURE 3. Analyses of cell area and Iba1 intensity in microglial cells isolated from the cerebellum. **(A, B)** Images of microglia isolated from the cerebellum of young WT and PCD mice labeled with Iba1 antibody (green). **(C)** The area of PCD cells was larger than that of WT cells. **(D)** Also, stronger Iba1 staining was found in PCD microglial cells. Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to a cell, the central black line to the mean and the error bars to the SD. $*p < 0,05$. Scale bar 50 μm .

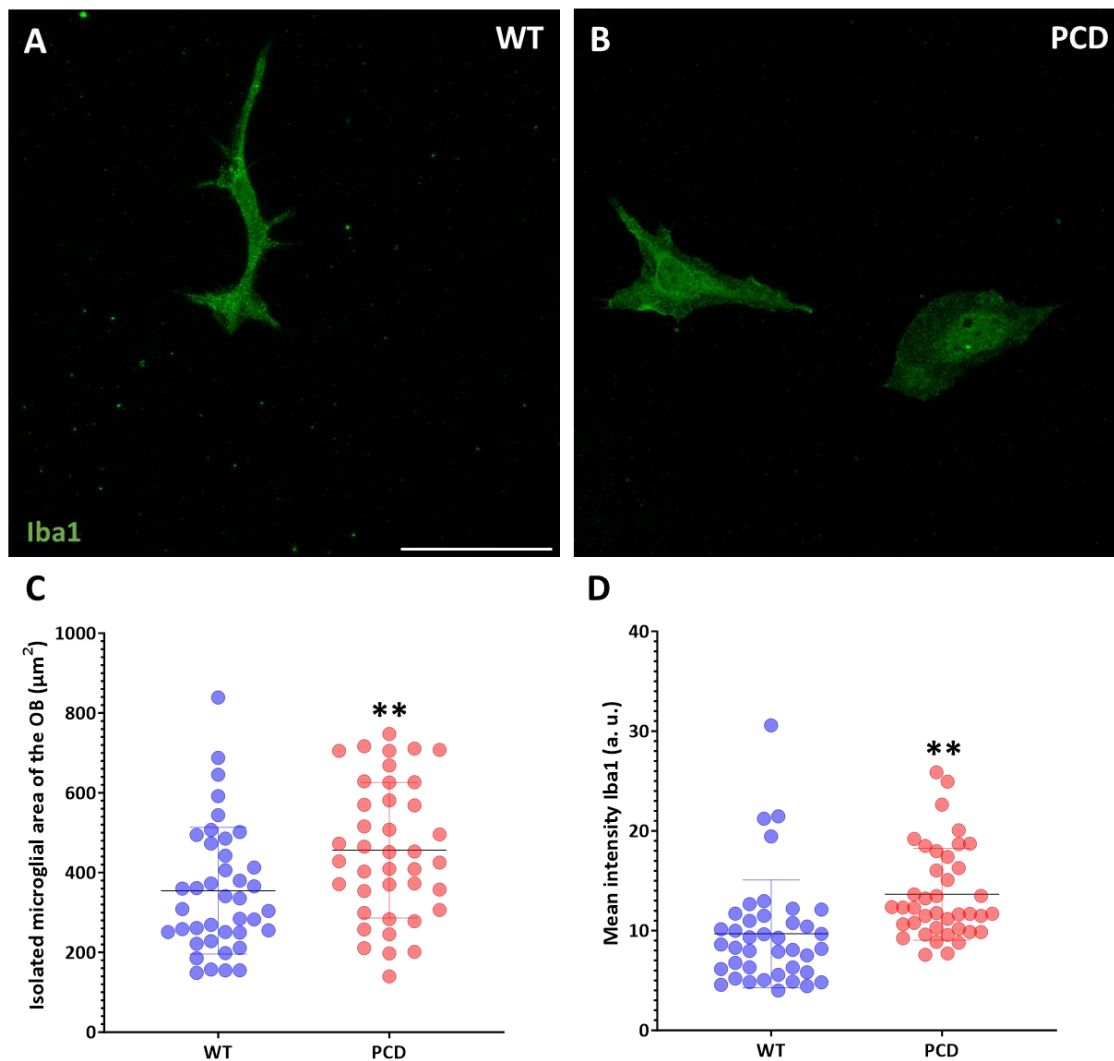


FIGURE 4. Analyses of cell area and Iba1 intensity in microglial cells isolated from OB. **(A, B)** Images of microglia isolated from OB of adult WT and PCD mice labeled with Iba1 antibody (green). **(C)** The area of PCD cells was larger than that of WT cells. **(D)** Similarly, stronger Iba1 staining was found in PCD microglia. Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to a cell, the central black line to the mean and the error bars to the SD. $**p < 0,01$. Scale bar 50 μm .

The analysis of the **phagocytic capacity** of microglia isolated from the cerebellum and OB demonstrated that PCD-type cells phagocytosed more neuronal debris than WT-type cells. In contrast with the experiments conducted in the other types of cultures, in this case cell size could influence the phagocytic capacity of microglia.

Finally, the **motility analysis** of microglia revealed that cells cultured from both PCD cerebellum and OB had higher motility compared to those from WT brains.

In vivo experiments

In vivo characterization of cerebellar and OB microglia

Gene analysis

The ages chosen for **cerebellar gene analysis** were P15 (before), P25 (during) and P40 (after Purkinje cell degeneration).

In the **cerebellum** of PCD mice at **P15**, significant increased expression of *Iba1*, *Cx3cr1* (markers of general microglia), *Trem2*, *Dap12*, *P2ry6* (markers of phagocytic capacity), *Ccl2* (marker of motility), *Tnf- α* , *Il-1 β* (proinflammatory markers) and *Arg1* (anti-inflammatory marker) was found in comparison with WT type mice. Therefore, before the onset of neurodegenerative processes in the cerebellum some genes related to motility and to proinflammatory and anti-inflammatory immune responses are already altered.

Regarding the analyses performed at **P25**, higher gene expression was observed in PCD mice in practically all the genes analyzed: *Iba1*, *Cx3cr1*, *Tmem119*, *Trem2*, *Dap12*, *P2ry6*, *Cd68*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Cd200r*, *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Arg1* and *Cd206*, *Inos* being the only exception. Therefore, during Purkinje cell degeneration, those genes involved in phagocytosis, motility and immune response are noteworthy highly expressed in the PCD mouse.

Finally, at **P40**, significant differences were observed between both experimental groups in the expression of *Cx3cr1*, *Trem2*, *Dap12*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Tlr2*, *Inos* and *Tnf- α* . Specifically, higher expression of *Cx3cr1*, *Trem2*, *Dap12*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Tlr2* and *Tnf- α* genes was found in PCD mice, whereas the opposite occurred with *Inos* gene, more expressed in WT animals. Thus, after Purkinje cell neurodegeneration, an increased expression of genes related to phagocytosis and proinflammatory immune response processes is still observed in the cerebellum of mutants, although at much lower levels. In addition, genes related to general microglial markers and motility processes are no longer altered. For their part, the ages chosen for **BO gene analysis** were P40 (before), P70 (during) and P120 (after mitral cell degeneration).

In the **OB** at **P40**, increased expression of *Ccl2*, *Tlr2*, *Tnf- α* , *Il-1 β* was found in PCD mice. Thus, before mitral cell degeneration, certain genes related to the processes of

English summary

phagocytosis, motility and innate and proinflammatory immune responses are already more expressed in PCD than in WT mice.

Analyses performed at **P70** revealed differences in the expression of virtually all genes analyzed: *Iba1*, *Cx3cr1*, *Tmem119*, *Trem2*, *Dap12*, *P2ry6*, *Cd68*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Tlr2*, *Tlr4*, *Tnf- α* , *Il1- β* , *Arg1* and *Cd206*, with the only exceptions of *Cd200r* and *Inos*. Thus, in addition to the increased expression of functional genes, an increase in the expression of genes related to general microglial markers was also observed in mutant animals, which would indicate an increase in the number of microglia and thus an increase in microglial proliferation.

Concerning the last age analyzed (**P120**), significantly higher expression was still observed in the OB of PCD mice for practically all the genes analyzed: *Iba1*, *Cx3cr1*, *Tmem119*, *Trem2*, *Dap12*, *P2ry6*, *Cd68*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Tlr2*, *Tnf- α* , *Il1- β* , *Arg1* and *Cd206*. At this age the expression of *Tlr2* and *Inos* showed no differences, and *Cd200r* was highly expressed in the OB of WT mice. Thus, even after mitral cell degeneration, high levels of expression corresponding to genes of general microglial markers and functions continue to be observed in the OB of PCD mice, although apparently at a lesser extent.

Immunohistological analysis

Using the general marker *Iba1*, changes in the density of microglia in the cerebellum and OB were assessed before, during and after Purkinje and mitral cell death, respectively. In addition, the reactive microglia marker CD45, the proinflammatory marker CD16/32 and the anti-inflammatory marker CD206 were used to study the phenotype adopted by these cells during the processes of maximal neurodegeneration in the cerebellum (P25) and BO (P70).

Analysis of microglial density

Starting with the analysis of the **cerebellum**, at **P15**, qualitatively similar patterns in terms of number, arrangement and microglial morphology were observed in both experimental models. When the density of microglial cells in the cerebellar vermis was estimated, similar values were observed in both genotypes, without significant differences (**Fig. 5**).

Conversely, at **P25**, striking differences were qualitatively observed between the two experimental groups in the number, distribution, and microglial morphology. To the

naked eye, a much higher number of microglia was apparent in the cerebellum of PCD mice compared to WT animals. Moreover, in WT mice microglia were homogeneously distributed throughout the cerebellar parenchyma, whereas in PCD mice microglia were concentrated around the degenerating neurons, specifically, in the molecular and Purkinje cell layers. The microglial morphology also showed differences since the microglia of WT mice were predominantly branched (typical of a normal physiological state), whereas the microglia of PCD showed more morphological variety: branched, amoeboid or hyperbranched, the latter being the most predominant. It should be noted that in the lobe X of the mutants, microglia behaved differently from the cells of the rest of the lobes, with characteristics like those of WT mice. After performing quantitative analyses, as expected, a much higher density of microglia was observed in the cerebellar vermis of PCD mice compared to WT mice, with significant differences between both experimental groups (Fig. 5).

Finally, at **P40**, qualitative differences were still observed between WT and PCD mice in terms of the number, distribution, and morphology of microglia, although not as evident as at the previous age. Again, quantitative analyses confirmed our qualitative assessment (Fig. 5).

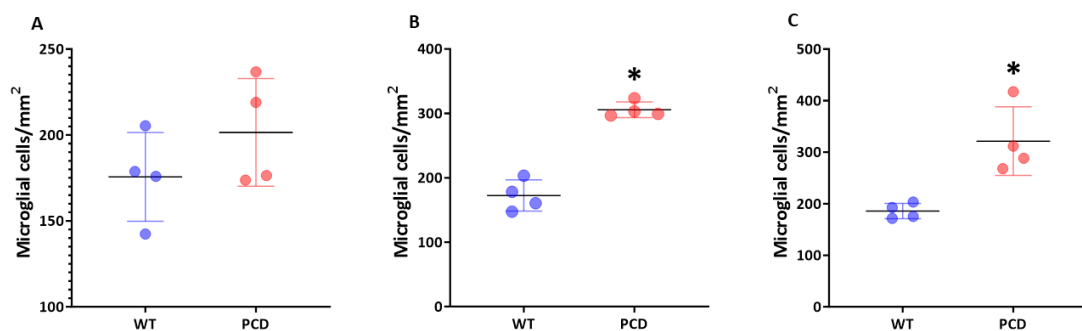


FIGURE 5. Analysis of microglia density in the cerebellum of WT and PCD mice at P15 (A), P25 (B) and P40 (C). Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to an experimental subject, the central black line to the mean and the error bars to the SD. * $p < 0,05$.

The analysis of microglial density in the **OB** at **P40** revealed similar values of microglial number, distribution, and morphology in both genotypes, without significant differences between them (Fig. 6).

At **P70**, subtle differences were qualitatively observed between WT and PCD mice in terms of morphology, number, and distribution of microglia. The morphology of the WT microglia predominantly presented a branched morphology (typical of healthy physiological states), whereas the mutant microglia was predominantly amoeboid or

less branched. After appropriate quantifications, during mitral cell degeneration at P70, a much higher density of microglia was observed in the OB of PCD mice compared to WT mice, also displaced towards the innermost layers (Fig. 6).

Finally, at **P120**, a similar distribution and morphology of microglia were observed in PCD mice, regarding to the previous age. Also, quantitative analyses demonstrated that in the OB of PCD mice there was a much higher density of microglia compared to WT mice (Fig. 6).

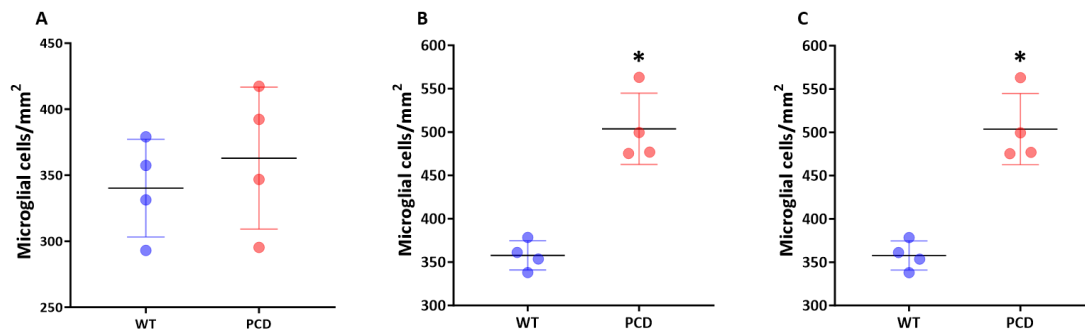


FIGURE 6. Analysis of microglia density in the OB of WT and PCD mice at P40 (A), P70 (B) and P120 (C). Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to an experimental subject, the central black line to the mean and the error bars to the SD. * $p < 0,05$.

Analysis of the microglial phenotype during neurodegenerative periods

We started with the study of the phenotype of **cerebellar** microglia by analyzing the expression of the marker **CD45** for reactive microglia. Our results demonstrated that PCD mice had significantly higher expression of CD45 than WT mice. With respect to the proinflammatory marker **CD16/32**, no relevant expression was found under the physiological conditions of WT mice. By contrast, strong labeling for CD16/32 was found in microglial cells of PCD mice along the cerebellar vermis. Finally, the study of the expression of the anti-inflammatory marker **CD206** demonstrated its presence in the microglia of both WT and PCD mice cerebellum but being predominant in the latter.

We then analyzed the microglial phenotype in the **OB**, and we observed that the **CD45** marker was significantly highly expressed in PCD mice. Regarding the **CD16/32** marker, no relevant expression was found in the microglia of WT mice, while it appeared in microglial cells of PCD mice. Finally, the expression of the **CD206** marker was observed in the bulbar microglia of both WT and PCD mice, being predominant in the latter, with significant differences.

Analysis of microglia-neuron interactions in the cerebellum and olfactory bulb

The axes of microglia-neuron interaction were analyzed by qPCR. In the **cerebellum**, these analyses were performed at P15, P25 and P40. At **P15**, significant differences were observed in the gene expression of *Cx3cr1* and *Ccl2*. In both cases, these genes were found to be more expressed in the cerebellum of PCD mice. Thus, before Purkinje cell degeneration the microglia-neuron communication axes *Cx3cl1-Cx3cr1* and *Ccl2-Ccr2* are already altered in the PCD mouse. At **P25**, significant differences were observed in the expression of the following genes: *Cx3cr1*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Cd200r* and *Cd200*. In all cases, the differences were due to an increase in their expression in PCD mice. Thus, during Purkinje cell degeneration all the microglia-neuron axes studied are altered. Finally, in the analyses performed at **P40**, significant differences were found in the expression of *Cx3cr1*, *Cx3cl1*, *Ccl2*, *Ccr2*, *Cd200* and *Cd200r* genes. In all cases, higher expressions were found in PCD mice, except for the *Cd200r* gene, more expressed in WT mice. Thus, even after Purkinje cell degeneration, microglia communication with neurons continued being compromised, with all analyzed axes altered.

Gene analyses in **OB** were performed at P40, P70 and P120. At **P40**, only significant differences in *Ccl2* gene expression were observed, being higher in the mutant animals. Thus, before the onset of BO mitral cell degeneration the microglia-neuron *Ccl2-Ccr2* communication axis is altered in the PCD mouse. At **P70**, significant differences were observed between both experimental groups for *Cx3cr1*, *Ccr2* and *Ccl2* genes, all of them showing higher expression in the PCD mice. Therefore, during mitral cell degeneration, in addition to the *Ccl2-Ccr2*, the *Cx3cl1-Cx3cr1* axis is also altered. Finally, at **P120**, significant differences were found between WT and PCD mice in the expression of *Cx3cr1*, *Ccr2*, *Ccl2* and *Cd200r* genes. Thus, after mitral cell degeneration, all microglia-neuron axes were affected, with up-regulated values in PCD mice.

Analysis of the effect of administration of the microglia inhibitor PLX5622.

Both motor behavioral analyses and immunohistochemical analyses were performed to analyze the distribution and survival of microglia and Purkinje cells in WT, PCD and PCD mice treated with PLX5622.

Analysis of motor behavior

The administration of the microglia inhibitor PLX5622 partially improved the motor behavior of PCD mice. Specifically, mutant animals treated with PLX5622 exhibited intermediate results in rota-rod test performance, between WT animals and untreated PCD animals.

Histological analysis

Histological analyses were done for two reasons: to verify that the drug eliminated microglia in treated mice, and to study the effects of PLX5622 into the Purkinje cells survival in PCD mice.

Microglial density was analyzed in the cerebellar vermis of the three experimental groups, higher values were observed in PCD animals compared to WT and PCD mice treated with PLX5622; for their part, the latter group obtained similar values. Therefore, it can be considered that the administration of PLX5622 significantly reduced microglia in the cerebellum of PCD mice, reaching values like those found in the cerebellum of WT mice.

The **Purkinje cell density** was significantly higher in WT mice than in both PCD groups. In addition, significant differences were found between PCD and PCD treated mice (**Fig. 7**). Finally, when analyzing the area of **Purkinje cell occupancy**, the values obtained in treated mutants were in an intermediate position with respect to those obtained in WT and PCD mice, with significant differences amongst the three experimental groups (**Fig. 7**). Therefore, these results demonstrate that the administration of PLX5622 improves the survival of Purkinje cells in the cerebellum of PCD mice due to microglial inhibition.

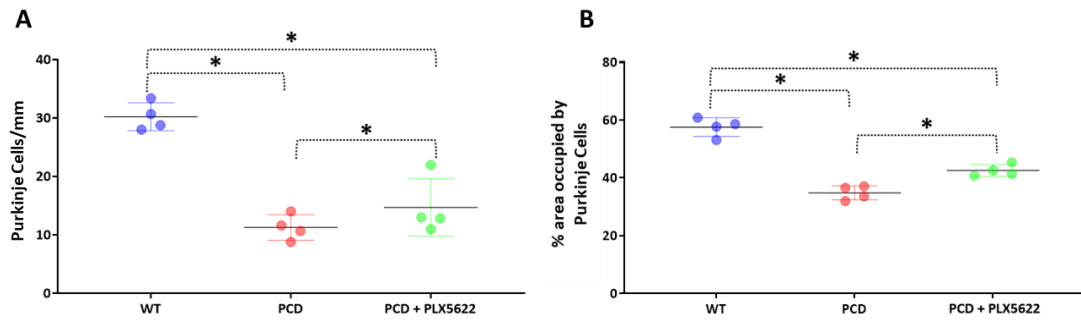


FIGURE 7. Analyses of density **(A)** and area occupied **(B)** by Purkinje cells in WT, PCD and PCD mice treated with PLX5622. Data are represented as the mean \pm SD, where each point corresponds to an experimental subject, the central black line to the mean and the error bars to the SD. * $p < 0,05$.

DISCUSSION

For a better understanding, the Discussion will be carried out attending separately to the in vitro and in vivo experimentation, as has been done throughout this Doctoral Thesis. In no case should both groups of experiments be considered as independent, since they try to answer together the same hypothesis, so there will always be cross references between both parts.

In vitro experimentation

Gene and protein expression of PCD-type microglial cells is altered

In PCD-type BMDML cells, a lower expression of general microglial markers (especially Iba1) was observed compared to WT-type cells, at both gene and protein level. Therefore, mutation in the *Ccp1* gene could affect cell differentiation processes. Previous studies from our laboratory had already shown that this mutation causes a delay in neuronal (Muñoz-Castañeda et al., 2018) and immune differentiation and maturation in the PCD mouse (Del Pilar et al., 2021). Likewise, the downregulation of CCP1 enzyme is involved in cell differentiation processes, promoting the formation of induced pluripotent cells, and favoring the maintenance of the pluripotent state of embryonic stem cells (Ye et al., 2018). Moreover, several investigations highlight the importance of microtubules in cell differentiation processes (Muroyama and Lechler, 2017; Akhmanova and Kapitein, 2022). Precisely, PCD-type cells present mutated *Ccp1*

English summary

gene, which codifies an enzyme in charge of depolyglutamylation of tubulins. Then, they probably present some kind of alteration in their cytoskeleton (Muñoz-Castañeda et al., 2018), causing the differentiation processes to not occur properly. Besides, Iba1 expression in both PCD-type BMDMLs and isolated microglia from the PCD cerebral cortex was found to be greatly decreased. Previous studies demonstrate that the distribution of Iba1 throughout the cytoplasm depends, in part, on the dynamics of the cytoskeleton. Then, the mutation in the *Ccp1* gene could lead to an alteration in the cellular distribution of Iba1, which would result in inadequate levels of this marker. Moreover, in certain pathologies, an anomalous or a decreased expression of Iba1 in the microglia of several encephalic regions has been observed (Hendrickx et al., 2017; Lier et al., 2019), and this could also occur in our animal model. By contrast, when studying microglial cells isolated from PCD cerebellum and OB during periods of maximal neuronal death, a higher Iba1 expression was observed, even greater than in WT cells. This radical change probably takes place in response to neurodegeneration processes (Murata et al., 2020). This fact is also corroborated by our *in vivo* results, especially in the case of PCD cerebellum. Then, the severity of degeneration is also directly related with the levels of Iba1.

The neurodegenerative environment of PCD triggers microglial hypertrophy

When analyzing the morphology of cells in culture, we observed that BMDML cells and microglia isolated from the cerebral cortex did not differ between experimental groups. Conversely, microglia gathered from the cerebellum and OB of PCD mice showed a striking different morphology compared to WT microglia: i.e. an increased frequency of amoeboid and highly branched cells. Both types of morphologies could be associated with a state of microglial activation caused by degeneration of either Purkinje or mitral cells, as occurs in other CNS pathologies (Paasila et al., 2019; Vidal-Itriago et al., 2022). In fact, both morphologies were the most observed during peak periods of neurodegeneration *in vivo* studies. Thus, it becomes evident that only when there is influence of neural damage, the size and shape of PCD microglia change with respect to WT one, acquiring an activation phenotype.

PCD-type microglia have an altered and origin-dependent phagocytic capacity

PCD-type BMDML cells showed a lower phagocytic capacity than their WT counterparts. Therefore, mutation in the *Ccp1* gene also compromises the phagocytic capacity of microglia, which could aggravate the development of a given nervous pathology (Beccari et al., 2023). Moreover, the decreased phagocytic capacity may be influenced by the reduced differentiation of PCD-type BMDML cells, as less microglial specialization leads to less development of their functions (Wu et al., 2019).

In contrast, microglial cells isolated from the cerebral cortex, cerebellum and OB showed higher values of phagocytosis in the PCD phenotype. Thus, the neural environment seems to be sufficient to change the phagocytic capacity of microglial cells, without neurodegeneration processes additionally influence this factor, at least under *in vitro* conditions. Additionally, the results obtained in the *in vivo* experiments, demonstrate that the neurodegeneration of both Purkinje and mitral cells leads to a supplementary increase in the phagocytic capacity of microglia. Likewise, microglia cultures isolated from both cerebellum and OB are abundant in amoeboid cells, a morphology that is associated in many nervous pathologies with an elevated phagocytic activity (Fu et al., 2014; Vidal-Itriago et al., 2022).

PCD-type microglial cells exhibit high motility

PCD-type cells from all microglia cultures presented higher motility than WT cells. Therefore, the *Ccp1* mutation also appears to be involved in microglia motility, in this case, elevating it. As previously discussed, the CCP1 protein is essential for the stabilization of cytoskeletal microtubules (Muñoz-Castañeda et al., 2018). Microtubules are known to be capable of restricting cell movement and specifying their directionality (Ganguly et al., 2012). Therefore, mutation in the *Ccp1* gene could be the cause of the altered motility observed in PCD microglia cells.

Bone marrow-derived microglial cells from PCD mice show increased proliferation capacity

Based on the results obtained in BMDMLs, it appears that mutation in the *Ccp1* gene increases cell proliferation. A possible explanation for this phenomenon is the lower differentiation of BMDML cells: by remaining in a more undifferentiated state, they probably possess a higher proliferative capacity (Zhu and Skoultchi, 2001; Ye et al., 2018). Likewise, the increased expression of proinflammatory genes in PCD-type BMDMLs may also contribute to this increased microglial proliferation (Jose et al., 2014). However, the results obtained with microglia cells isolated from the cerebral cortex were somehow discrepant. In any case, although the mutation in the *Ccp1* gene makes microglia tend to proliferate more, a healthy neuronal environment would control such proliferation under homeostatic conditions, like the values observed in WT models (Oria et al. 2018). When a neurodegenerative environment appears (i.e. in the case of *in vivo* experiments, see later), microglial cells lose their control and proliferates again.

In vivo experimentation

Microglia in the cerebellum and olfactory bulb of PCD mice exhibit a gene and protein expression characteristic of activation states

Prior to the onset of neurodegenerative processes in both cerebellum and OB, an elevated expression of genes of general microglia, phagocytosis, motility, and pro- and anti-inflammatory response was observed.

Such expression indicates a microglial activation before any neuronal loss takes place (Zheng et al., 2016; Franco-Bocanegra et al., 2019). Previous studies from our laboratory demonstrated ultrastructural and morphological alterations in Purkinje (Muñoz-Castañeda et al., 2018) and mitral cells (Valero et al., 2006) of PCD mice during the pre-neurodegenerative stage (i.e. before any evident neurodegeneration). Our results suggest that microglia would be able to detect these small faults or variations in their

environment, probably to reverse an imminent situation of neuronal death and maintain the homeostasis of the system.

During the processes of maximum neurodegeneration of the cerebellum and OB, an elevated expression of practically all the microglial genes analyzed was observed. This fact indicates a dramatic activation of microglia in both nervous structures, probably in response to the degeneration of Purkinje and mitral cells (Landis and Mullen, 1978; Valero et al., 2007; Muñoz-Castañeda et al., 2018). An increased expression of general-type genes involves both augmented activity and proliferation of microglia. For its part, the overexpression of genes related to phagocytosis and motility demonstrates an increase in both functions. Thus, the microglia of PCD mice would acquire an activated phenotype and an increased motility and phagocytic capacity with the aim of moving throughout the nervous parenchyma towards dead neurons to phagocytose them to restore the homeostasis of the system, as it occurs in various neurodegenerative pathologies (Butler et al., 2021; Gao et al., 2023). Moreover, this microglial behavior would agree with the *in vitro* results, which showed that PCD microglia isolated from both cerebellum and OB exhibit higher phagocytosis and motility than WT.

While the microglial morphology observed before neuronal death was predominantly branched (resting microglia), the phenotype corresponding to the period of maximum neurodegeneration was amoeboid and hyperbranched, both morphologies related to states of microglial activation (Parakalan et al., 2012; Boche et al., 2013; Vidal-Itriago et al., 2022). This morphological change due to neuronal damage had been already observed in our *in vitro* experiments. Precisely, the increased expression of genes such as *Tnf- α* or *Ccl2* reduces the extension of cell branching (Adrian et al., 2023), which would favor the acquisition of these morphologies: amoeboid microglia do not present branching and hyperramified microglia present short branching (Ladeby et al., 2005). An increase in cell area was also observed, which is congruent with results of cultured microglia isolated from the cerebellum and OB during neuronal degeneration. Previous research demonstrates that an increased microglial cell area is associated with a state of activation in response to a noxious stimulus (Davis et al., 2017).

Consistent with the above ideas, the increased expression of immune response genes would correspond to a release of pro-inflammatory and anti-inflammatory mediators. The former facilitate the inflammatory response and play an essential role in repairing

English summary

processes after damage. However, their massive and uncontrolled release -that seems to occur in the PCD model- could aggravate the death of both Purkinje and mitral cells, causing additional damage to the surrounding nervous tissue (Zheng et al., 2016). This hypothesis fits perfectly with what has been observed in the cerebellum, where the release of inflammatory mediators is massive and much higher than in OB, thus providing an explanation for why Purkinje cell death is so sudden and rapid. On the contrary, in the OB of PCD mice, although the expression of inflammatory response genes raises, it is not as high as in the cerebellum, explaining why mitral cell degeneration is slower and more prolonged in time. For its part, the increased expression of anti-inflammatory genes would correspond to a hypothetical revert of the negative effects associated with excessive inflammation (although without effective success), with the aim of a tissue repair process (Vezzani et al., 2013).

Once the primary neurodegenerative processes finished, both cerebellar and bulbar microglia continued to express elevated gene levels corresponding to phagocytic capacity, motility, and immune response. However, this expression was lower than that produced during neurodegenerative processes, probably due to the cessation of neuronal death. Surprisingly, this fact was more striking in OB: during the post-degenerative period an upward expression of practically all the genes analyzed was maintained. This shows that the microglial response that occurs in the OB is prolonged in time. Therefore, it is a chronic microglial reaction that could trigger the death of both surviving mitral cells and other neuronal populations (Recio et al., 2007; Valero et al., 2007).

Communication between microglia and neurons in the PCD mouse is compromised before, during and after neurodegenerative processes

We have observed alterations in the expression of genes that constitute some of the best-known axes of microglia-neuron communication in the PCD mouse. These alterations appeared at all ages analyzed, especially during the processes of maximum degeneration of the cerebellum and the OB. Therefore, the destabilization of the microglia-neuron axes would be a clear indication of microglia activation in the PCD

mouse due to a pathological situation. Furthermore, the dysregulation of microglia-neuron communication was greater in the cerebellum than in the OB, as the communication axes were more altered in the former. Specifically, before the onset of neurodegenerative processes in the cerebellum two axes were altered, whereas in the OB only one did. During the stages of maximum neurodegeneration, the three analyzed axes were impaired in the cerebellum, whereas only two changed in the BO. Only at the end of the neurodegenerative processes, similar results were found in both structures, with all axes altered. Therefore, the microglia-neuron axes keep impaired, even when the neurodegenerative processes have ended. In sum, the greater the neuronal damage, the greater the dysregulation and microglial response.

Administration of PLX5622 results in increased Purkinje cell survival and improved motor skills in PCD mice

Once the remarkable alteration of the microglia in PCD mice was demonstrated in both *in vitro* and *in vivo* scenarios, we wanted to demonstrate definitively whether microgliosis could be a cause or simply the consequence of neurodegenerative processes in this animal model. This last study focused only on the cerebellum, because it is the nervous region of PCD mice where the most aggressive and evident neurodegenerative processes occur and, therefore, where microgliosis is more dramatic (Baltanás et al., 2013).

After the administration of PLX5622, an elimination of the microglia was found, which favored the survival of Purkinje cells, thus demonstrating that although the exacerbated microgliosis of the cerebellum is not the primary and direct cause of Purkinje cell death, it does favor their loss. In some CNS pathologies, such as brain injuries due to trauma, the inhibition of microglia reduces neurodegeneration of the affected area due to the elimination of the excessive inflammation that occurs after the stroke (Henry et al., 2020; Li et al., 2020). Possibly the same circumstance occurs in the PCD model: eliminating its microglia would reduce the exacerbated inflammatory state of the cerebellum.

In addition to the increased survival of Purkinje cells, improvements in ataxia of PCD mice were found when PLX5622 was administered. These improvements have been seen in other models of nervous pathology, such as in brain injury due to trauma: by

eliminating microglia, mice improved their motor abilities after the pathological process (Henry et al., 2020; Witcher et al., 2021). Other studies related to chronic inflammation due to aging have shown that the elimination of microglia also reduces neuronal death. The cause is a decrease in the production of proinflammatory mediators by microglia, as well as a reduction in astrocyte activation and reactivity (Park et al., 2021; Stojiljkovic et al., 2022).

CONCLUSIONS

In accordance with the objectives set out in this Doctoral Thesis, and in view of the results obtained and their discussion, we draw the following conclusions:

- I. Without the influence of the neural environment -physiological or pathological- PCD type microglia present a reduced phagocytosis and high motility and proliferation. **The *Ccp1* gene *per se* is involved in the normal functioning of microglia.**
- II. The physiological neural environment influences some characteristics of PCD microglia: it increases their phagocytic capacity and decreases their proliferation. **The neural environment is determinant *per se* to change - even reverse- some functions of microglia with altered *Ccp1* gene.**
- III. A pathological environment alters further PCD-type microglia: it proliferates again largely, adopts a more amoeboid and hyperramified form, and markedly increases the expression of Iba1. **A pathological environment is required for microglia with altered *Ccp1* gene to become effectively activated.**
- IV. The *in vivo* results corroborate those obtained *in vitro*: during maximum PCD degeneration there is an elevated gene and protein expression of microglial activation markers (pro- and anti-inflammatory), and an alteration of microglial communication with neurons, especially in the cerebellum. **The pathological environment predisposes, proportionally to its severity, to microglia acquiring a particular phenotype of immune activation.**
- V. The change in microglial biology is very apparent in the cerebellum of the PCD mouse but it is rapidly attenuated. In the OB such alteration is more

moderate, but it is maintained over time. **The biology of microglia and the degree of neurodegeneration -intensity and duration- go hand in hand.**

- VI. Depletion of microglia with PLX5622 improves Purkinje cell survival and motor ability in the PCD mouse. **Exacerbated microgliosis aggravates Purkinje cell loss, which accentuates cerebellar ataxia.**

BIBLIOGRAPHY

This summary does not include a specific bibliography, since the references used here are a part integrated in the bibliography of the extended memory of the Doctoral Thesis. For any consultation, please see the original document.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abiega O, Beccari S, Diaz-Aparicio I, Nadjar A, Layé S, Leyrolle Q, Gómez-Nicola D, Domercq M, Pérez-Samartín A, Sánchez-Zafra V, Paris I, Valero J, Savage JC, Hui CW, Tremblay MÈ, Deudero JJ, Brewster AL, Anderson AE, Zaldumbide L, Galbarriatu L, Marinas A, Vivanco Md, Matute C, Maletic-Savatic M, Encinas JM, Sierra A (2016) *Neuronal Hyperactivity Disturbs ATP Microgradients, Impairs Microglial Motility, and Reduces Phagocytic Receptor Expression Triggering Apoptosis/Microglial Phagocytosis Uncoupling*. *PLoS Biol* 14:e1002466.

Adrian M, Weber M, Tsai MC, Glock C, Kahn OI, Phu L, Cheung TK, Meilandt WJ, Rose CM, Hoogenraad CC (2023) *Polarized microtubule remodeling transforms the morphology of reactive microglia and drives cytokine release*. *Nat Commun* 14:6322.

Ahmed Z, Shaw G, Sharma VP, Yang C, McGowan E, Dickson DW (2007) *Actin-binding proteins coronin-1a and IBA-1 are effective microglial markers for immunohistochemistry*. *J Histochem Cytochem* 55:687-700.

Ahuja S, Lazar IM (2021) *Systems-Level Proteomics Evaluation of Microglia Response to Tumor-Supportive Anti-Inflammatory Cytokines*. *Front Immunol* 12:646043.

Akhmanova A, Kapitein LC (2022) *Mechanisms of microtubule organization in differentiated animal cells*. *Nat Rev Mol Cell Biol* 23:541-558.

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

Ali S, Mansour AG, Huang W, Queen NJ, Mo X, Anderson JM, Hassan QN 2nd, Patel RS, Wilkins RK, Caligiuri MA, Cao L (2020) *CSF1R inhibitor PLX5622 and environmental enrichment additively improve metabolic outcomes in middle-aged female mice*. *Aging* 12:2101-2122.

Allen P (2004) *Allen institute for brain science. Allen brain atlas*. Allen Institute for Brain Science. Seattle, WA.

Al-Onaizi M, Al-Khalifah A, Qasem D, ElAli A (2020) *Role of Microglia in Modulating Adult Neurogenesis in Health and Neurodegeneration*. *Int J Mol Sci* 21:6875.

Amaya JM, Suidgeest E, Sahut-Barnola I, Dumontet T, Montanier N, Pagès G, Keller C, van der Weerd L, Pereira AM, Martinez A, Meijer OC (2021) *Effects of Long-Term Endogenous Corticosteroid Exposure on Brain Volume and Glial Cells in the AdKO Mouse*. *Front Neurosci* 15:604103.

Amore G, Spoto G, Ieni A, Vetri L, Quatrosi G, Di Rosa G, Nicotera AG (2021) *A Focus on the Cerebellum: From Embryogenesis to an Age-Related Clinical Perspective*. *Front Syst Neurosci* 15:646052.

Antony JM, Paquin A, Nutt SL, Kaplan DR, Miller FD (2011) *Endogenous microglia regulate development of embryonic cortical precursor cells*. *J Neurosci Res* 89:286-298.

Arbaizar-Roviroso M, Pedragosa J, Lozano JJ, Casal C, Pol A, Gallizioli M, Planas AM (2023) *Aged lipid-laden microglia display impaired responses to stroke*. *EMBO Mol Med* 15:e17175.

Arnò B, Grassivaro F, Rossi C, Bergamaschi A, Castiglioni V, Furlan R, Greter M, Favaro R, Comi G, Becher B, Martino G, Muzio L (2014) *Neural progenitor cells orchestrate microglia migration and positioning into the developing cortex*. *Nat Commun* 5:5611.

B

Baker H, Greer CA (1990) *Region-specific consequences of PCD gene expression in the olfactory system*. *J Comp Neurol* 293:125-33.

Bibliografía

Baltanás FC, Berciano MT, Santos E, Lafarga M (2021) *The Childhood-Onset Neurodegeneration with Cerebellar Atrophy (CONDCA) Disease Caused by AGTPBP1 Gene Mutations: The Purkinje Cell Degeneration Mouse as an Animal Model for the Study of this Human Disease*. *Biomedicines* 9:1157.

Baltanás FC, Berciano MT, Tapia O, Narcis JO, Lafarga V, Díaz D, Weruaga E, Santos E, Lafarga M (2019) *Nucleolin reorganization and nucleolar stress in Purkinje cells of mutant PCD mice*. *Neurobiol Dis* 127:312-322.

Baltanás FC, Berciano MT, Valero J, Gómez C, Díaz D, Alonso JR, Lafarga M, Weruaga E (2013) *Differential glial activation during the degeneration of Purkinje cells and mitral cells in the PCD mutant mice*. *Glia* 61:254-272.

Baltanás FC, Casafont I, Weruaga E, Alonso JR, Berciano MT, Lafarga M (2011) *Nucleolar disruption and cajal body disassembly are nuclear hallmarks of DNA damage-induced neurodegeneration in purkinje cells*. *Brain Pathol* 21:374-388.

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

Basilico B, Ferrucci L, Ratano P, Golia MT, Grimaldi A, Rosito M, Ferretti V, Reverte I, Sanchini C, Marrone MC, Giubettini M, De Turris V, Salerno D, Garofalo S, St-Pierre MK, Carrier M, Renzi M, Pagani F, Modi B, Raspa M, Scavizzi F, Gross CT, Marinelli S, Tremblay MÈ, Caprioli D, Maggi L, Limatola C, Di Angelantonio S, Ragozzino D (2022) *Microglia control glutamatergic synapses in the adult mouse hippocampus*. *Glia* 70:173-195.

Bäurle J, Helmchen C, Grüsser-Cornehls U (1997) *Diverse effects of Purkinje cell loss on deep cerebellar and vestibular nuclei neurons in Purkinje cell degeneration mutant mice: a possible compensatory mechanism*. *J Comp Neurol* 384:580-596.

Beccari S, Sierra-Torre V, Valero J, Pereira-Iglesias M, García-Zaballa M, Soria FN, De Las Heras-García L, Carretero-Guillen A, Capetillo-Zarate E, Domercq M, Huguet PR, Ramonet D, Osman A, Han W, Dominguez C, Faust TE, Touzani O, Pampliega O, Boya P, Schafer D, Mariño G, Canet-Soulas E, Blomgren K, Plaza-Zabala A, Sierra A (2023) *Microglial phagocytosis dysfunction in stroke is driven by energy depletion and induction of autophagy*. *Autophagy* 19:1952-1981.

Berezniuk I, Sironi J, Callaway MB, Castro LM, Hirata IY, Ferro ES, Fricker LD (2010) *CCP1/Nna1 functions in protein turnover in mouse brain: Implications for cell death in Purkinje cell degeneration mice*. *FASEB J* 24:1813-1823.

Berezniuk I, Sironi J, Wardman J, Pasek RC, Berbari NF, Yoder BK, Fricker LD (2013) *Quantitative peptidomics of Purkinje cell degeneration mice*. *PLoS One* 8:e60981.

Berezniuk I, Vu HT, Lyons PJ, Sironi JJ, Xiao H, Burd B, Setou M, Angeletti RH, Ikegami K, Fricker LD (2012) *Cytosolic carboxypeptidase 1 is involved in processing α - and β -tubulin*. *J Biol Chem* 287:6503-6517.

Bernier LP, Bohlen CJ, York EM, Choi HB, Kamyabi A, Dissing-Olesen L, Hefendehl JK, Collins HY, Stevens B, Barres BA, MacVicar BA (2019) *Nanoscale Surveillance of the Brain by Microglia via cAMP-Regulated Filopodia*. *Cell Rep* 27:2895-2908.

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

Blanks JC, Spee C (1992) *Retinal degeneration in the pcd/pcd mutant mouse: accumulation of spherules in the interphotoreceptor space*. *Exp Eye Res* 54:637-644.

Blinzinger K, Kreutzberg G (1968) *Displacement of synaptic terminals from regenerating motoneurons by microglial cells*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 85:145-157.

Boche D, Perry VH, Nicoll JA (2013) *Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain*. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39:3-18.

Bohlen CJ, Bennett FC, Bennett ML (2019) *Isolation and Culture of Microglia*. *Curr Protoc Immunol* 125:e70.

Borst K, Dumas AA, Prinz M (2021) *Microglia: Immune and non-immune functions*. *Immunity* 54:2194-2208.

Brás JP, Bravo J, Freitas J, Barbosa MA, Santos SG, Summavielle T, Almeida MI (2020) *TNF-alpha-induced microglia activation requires miR-342: impact on NF-kB signaling and neurotoxicity*. *Cell Death Dis* 11:415.

Bruttger J, Karram K, Wörtge S, Regen T, Marini F, Hoppmann N, Klein M, Blank T, Yona S, Wolf Y, Mack M, Pinteaux E, Müller W, Zipp F, Binder H, Bopp T, Prinz M, Jung S, Waisman A (2015) *Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System*. *Immunity* 43:92-106.

Bureta C, Setoguchi T, Saitoh Y, Tominaga H, Maeda S, Nagano S, Komiya S, Yamamoto T, Taniguchi N (2019) *TGF-β Promotes the Proliferation of Microglia In Vitro*. *Brain Sci* 10:20.

Butler CA, Popescu AS, Kitchener EJA, Allendorf DH, Puigdellívol M, Brown GC (2021) *Microglial phagocytosis of neurons in neurodegeneration, and its regulation*. *J Neurochem* 158:621-639.

C

Carroll JA, Race B, Williams K, Striebel J, Chesebro B (2018) *Microglia Are Critical in Host Defense against Prion Disease*. *J Virol* 92:e00549.

Carta I, Chen CH, Schott AL, Dorizan S, Khodakhah K (2019) *Cerebellar modulation of the reward circuitry and social behavior*. *Science* 363:eaav0581.

Chagas LDS, Sandre PC, Ribeiro E, Ribeiro NCA, Marcondes H, Oliveira Silva P, Savino W, Serfaty CA (2020) *Environmental Signals on Microglial Function during Brain Development, Neuroplasticity, and Disease*. *Int J Mol Sci* 21:2111.

Chen G, Zhang YQ, Qadri YJ, Serhan CN, Ji RR (2018) *Microglia in Pain: Detrimental and Protective Roles in Pathogenesis and Resolution of Pain*. *Neuron* 100:1292-1311.

Cheron G, Ristori D, Marquez-Ruiz J, Cebolla AM, Ris L (2022) *Electrophysiological alterations of the Purkinje cells and deep cerebellar neurons in a mouse model of Alzheimer disease (electrophysiology on cerebellum of AD mice)*. *Eur J Neurosci* 56:5547-5563.

Cherry JD, Meng G, Daley S, Xia W, Svirsky S, Alvarez VE, Nicks R, Pothast M, Kelley H, Huber B, Tripodis Y, Alosco ML, Mez J, McKee AC, Stein TD (2020) *CCL2 is associated with microglia and macrophage recruitment in chronic traumatic encephalopathy*. *J Neuroinflammation* 17:370.

Church KA, Rodriguez D, Mendiola AS, Vanegas D, Gutierrez IL, Tamayo I, Amadu A, Velazquez P, Cardona SM, Gyoneva S, Cotleur AC, Ransohoff RM, Kaur T, Cardona AE (2023) *Pharmacological depletion of microglia alleviates neuronal and vascular damage in the diabetic CX3CR1-WT retina but not in CX3CR1-KO or hCX3CR1I249/M280-expressing retina*. *Front Immunol* 14:1130735

Cleland TA (2014) *Construction of odor representations by olfactory bulb microcircuits*. *Prog Brain Res* 208:177-203.

Cleland TA, Borthakur A (2020) *A Systematic Framework for Olfactory Bulb Signal Transformations*. *Front Comput Neurosci* 14:579143.

Bibliografía

Coimbra S, Figueiredo A, Castro E, Rocha-Pereira P, Santos-Silva A (2012) *The roles of cells and cytokines in the pathogenesis of psoriasis*. Int J Dermatol 51:389-95.

Colombo G, Cubero RJA, Kanari L, Venturino A, Schulz R, Scolamiero M, Agerberg J, Mathys H, Tsai LH, Chachólski W, Hess K, Siegert S (2022) *A tool for mapping microglial morphology, morphOMICs, reveals brain-region and sex-dependent phenotypes*. Nat Neurosci 25:1379-1393.

Colonna M, Butovsky O (2017) *Microglia Function in the Central Nervous System During Health and Neurodegeneration*. Annu Rev Immunol 35:441-468.

Cornell J, Salinas S, Huang HY, Zhou M (2022) *Microglia regulation of synaptic plasticity and learning and memory*. Neural Regen Res 17:705-716.

Crespo C, Gracia-Llanes FJ, Gutiérrez-Mecinas M, Blasco-Ibáñez JM, Marqués-Marí AI, Náchter J, Varea E, Martínez-Guijarro FJ (2006) *El bulbo olfativo de los mamíferos: aspectos de su organización anatómica*. En: Alonso JR, de Castro F, López-Mascaraque L (Eds.) La olfacción en España 71-95. SBI, Salamanca.

Cserép C, Pósfai B, Dénes Á (2021) *Shaping Neuronal Fate: Functional Heterogeneity of Direct Microglia-Neuron Interactions*. Neuron 109:222-240.

Cunningham CL, Martínez-Cerdeño V, Noctor SC (2013) *Microglia regulate the number of neural precursor cells in the developing cerebral cortex*. J Neurosci 33:4216-4233.

Cyske Z, Gaffke L, Pierzynowska K, Węgrzyn G (2023) *Tubulin Cytoskeleton in Neurodegenerative Diseases-not Only Primary Tubulinopathies*. Cell Mol Neurobiol 43:1867-1884.

D

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

Davis BM, Salinas-Navarro M, Cordeiro MF, Moons L, De Groef L (2017) *Characterizing microglia activation: a spatial statistics approach to maximize information extraction*. Sci Rep 7:1576.

Del Pilar C, Lebrón-Galán R, Pérez-Martín E, Pérez-Revuelta L, Ávila-Zarza CA, Alonso JR, Clemente D, Weruaga E, Díaz D (2021) *The Selective Loss of Purkinje Cells Induces Specific Peripheral Immune Alterations*. Front Cell Neurosci 15:773696.

Deng W, Chen W, Zhang Z, Huang S, Kong W, Sun Y, Tang X, Yao G, Feng X, Chen W, Sun L (2015) *Mesenchymal stem cells promote CD206 expression and phagocytic activity of macrophages through IL-6 in systemic lupus erythematosus*. Clin Immunol 161:209-216.

Dermitzakis I, Manthou ME, Meditskou S, Tremblay MÈ, Petratos S, Zoupi L, Boziki M, Kesidou E, Simeonidou C, Theotokis P (2023) *Origin and Emergence of Microglia in the CNS-An Interesting (Hi)story of an Eccentric Cell*. Curr Issues Mol Biol 45:2609-2628.

Díaz-Aparicio I, Beccari S, Abiega O, Sierra A (2016) *Clearing the corpses: regulatory mechanisms, novel tools, and therapeutic potential of harnessing microglial phagocytosis in the diseased brain*. Neural Regen Res 11:1533-1539.

Díaz-Aparicio I, Paris I, Sierra-Torre V, Plaza-Zabala A, Rodríguez-Iglesias N, Márquez-Roperó M, Beccari S, Huguet P, Abiega O, Alberdi E, Matute C, Bernales I, Schulz A, Otrókocsi L, Sperlagh B, Happonen KE, Lemke G, Maletic-Savatic M, Valero J, Sierra A (2020) *Microglia Actively Remodel Adult Hippocampal Neurogenesis through the Phagocytosis Secretome*. J Neurosci 40:1453-1482.

Díaz D, Gómez C, Muñoz-Castañeda R, Baltanás F, Alonso JR, Weruaga E (2013) *The olfactory system as a puzzle: playing with its pieces*. Anat Rec 296:1383-1400.

Díaz D, Lepousez G, Gheusi G, Alonso JR, Lledo PM, Weruaga E (2012) *Bone marrow cell transplantation restores olfaction in the degenerated olfactory bulb*. J Neurosci 32:9053-9058.

Díaz D, Muñoz-Castañeda R, Ávila-Zarza C, Carretero J, Alonso JR, Weruaga E (2017) *Olfactory bulb plasticity ensures proper olfaction after severe impairment in postnatal neurogenesis*. Sci Rep 7:5654.

Ding X, Gu R, Zhang M, Ren H, Shu Q, Xu G, Wu H (2018) *Microglia enhanced the angiogenesis, migration and proliferation of co-cultured RMECs*. BMC Ophthalmol 18:249.

Dionisio-Santos DA, Olschowka JA, O'Banion MK (2019) *Exploiting microglial and peripheral immune cell crosstalk to treat Alzheimer's disease*. J Neuroinflammation 16:74.

Dixon MA, Greferath U, Fletcher EL, Jobling AI (2021) *The Contribution of Microglia to the Development and Maturation of the Visual System*. Front Cell Neurosci 15:659843.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1997) *Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain*. J Neurosci 17:5046-5061.

Doorn KJ, Brevé JJ, Drukarch B, Boddeke HW, Huitinga I, Lucassen PJ, van Dam AM (2015) *Brain region-specific gene expression profiles in freshly isolated rat microglia*. Front Cell Neurosci 9:84.

Doorn KJ, Goudriaan A, Blits-Huizinga C, Bol JG, Rozemuller AJ, Hoogland PV, Lucassen PJ, Drukarch B, van de Berg WD, van Dam AM (2014) *Increased amoeboid microglial density in the olfactory bulb of Parkinson's and Alzheimer's patients*. Brain Pathol 24:152-165.

Du L, Zhang Y, Chen Y, Zhu J, Yang Y, Zhang HL (2017) *Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target*. Mol Neurobiol 54:7567-7584.

E

Eckmeier D, Shea SD (2014) *Noradrenergic plasticity of olfactory sensory neuron inputs to the main olfactory bulb*. J Neurosci 34:15234-15243.

El Hajj H, Savage JC, Bisht K, Parent M, Vallières L, Rivest S, Tremblay MÈ (2019) *Ultrastructural evidence of microglial heterogeneity in Alzheimer's disease amyloid pathology*. J Neuroinflammation 16:87.

Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, Kitazawa M, Matusow B, Nguyen H, West BL, Green KN (2014) *Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain*. Neuron 82:380-397.

Ernst TM, Brol AE, Gratz M, Ritter C, Bingel U, Schlamann M, Maderwald S, Quick HH, Merz CJ, Timmann D (2019) *The cerebellum is involved in processing of predictions and prediction errors in a fear conditioning paradigm*. Elife 8:e46831.

Eyo UB, Peng J, Swiatkowski P, Mukherjee A, Bispo A, Wu LJ (2014) *Neuronal hyperactivity recruits microglial processes via neuronal NMDA receptors and microglial P2Y12 receptors after status epilepticus*. J Neurosci 34:10528-10540.

Eyo UB, Wu LJ (2013) *Bidirectional microglia-neuron communication in the healthy brain*. Neural Plast 2013:456857.

F

Fan H, Bai Q, Yang Y, Shi X, Du G, Yan J, Shi J, Wang D (2023) *The key roles of reactive oxygen species in microglial inflammatory activation: Regulation by endogenous antioxidant system and exogenous sulfur-containing compounds*. Eur J Pharmacol 956:175966.

Bibliografía

Fang S, Wu Z, Guo Y, Zhu W, Wan C, Yuan N, Chen J, Hao W, Mo X, Guo X, Fan L, Li X, Chen J (2023) *Roles of microglia in adult hippocampal neurogenesis in depression and their therapeutics*. *Front Immunol* 14:1193053.

Fenton MJ, Buras JA, Donnelly RP (1992) *IL-4 reciprocally regulates IL-1 and IL-1 receptor antagonist expression in human monocytes*. *J Immunol* 149:1283-1288.

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

Ferreira R, Santos T, Gonçalves J, Baltazar G, Ferreira L, Agasse F, Bernardino L (2012) *Histamine modulates microglia function*. *J Neuroinflammation* 9:90.

Franco-Bocanegra DK, McAuley C, Nicoll JAR, Boche D (2019) *Molecular Mechanisms of Microglial Motility: Changes in Ageing and Alzheimer's Disease*. *Cells* 8:639.

Fu R, Shen Q, Xu P, Luo JJ, Tang Y (2014) *Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases*. *Mol Neurobiol* 49:1422-1434.

G

Ganguly A, Yang H, Sharma R, Patel KD, Cabral F (2012) *The role of microtubules and their dynamics in cell migration*. *J Biol Chem* 287:43359-43369.

Gao C, Jiang J, Tan Y, Chen S (2023) *Microglia in neurodegenerative diseases: mechanism and potential therapeutic targets*. *Signal Transduct Target Ther* 8:359.

Gilmore-Hall S, Kuo J, Ward JM, Zahra R, Morrison RS, Perkins G, La Spada AR (2019) *CCP1 promotes mitochondrial fusion and motility to prevent Purkinje cell neuron loss in pcd mice*. *J Cell Biol* 218:206-219.

Giulian D, Baker TJ (1986) *Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain*. *J Neurosci* 6:2163-2178.

Gheorghe RO, Deftu A, Filippi A, Grosu A, Bica-Popi M, Chiritoiu M, Chiritoiu G, Munteanu C, Silvestro L, Ristoiu V (2020) *Silencing the Cytoskeleton Protein Iba1 (Ionized Calcium Binding Adapter Protein 1) Interferes with BV2 Microglia Functioning*. *Cell Mol Neurobiol* 40:1011-1027.

Ginhoux F, Lim S, Hoeffel G, Low D, Huber T (2013) *Origin and differentiation of microglia*. *Front Cell Neurosci* 7:45.

Goldmann T, Prinz M (2013) *Role of microglia in CNS autoimmunity*. *Clin Dev Immunol* 2013:208093.

Goshi N, Morgan RK, Lein PJ, Seker E (2020) *A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation*. *J Neuroinflammation* 17:155.

Green TRF, Murphy SM, Moreno-Montano MP, Audinat E, Rowe RK (2022) *Reactive morphology of dividing microglia following kainic acid administration*. *Front Neurosci* 16:972138.

Greer CA, Halász N (1987) *Plasticity of dendrodendritic microcircuits following mitral cell loss in the olfactory bulb of the murine mutant Purkinje cell degeneration*. *J Comp Neurol* 256:284-298.

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

Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014) *Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity*. *Annu Rev Immunol* 32:659-702.

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

Gu X, Zhao Z, Chen X, Zhang L, Fang H, Zhao T, Ju S, Gao W, Qian X, Wang X, Zhang J, Cheng H (2023) *Imaging microglia surveillance during sleep-wake cycles in freely behaving mice*. Elife 12:RP86749.

Guo Y, Hong W, Wang X, Zhang P, Körner H, Tu J, Wei W (2019) *MicroRNAs in Microglia: How do MicroRNAs Affect Activation, Inflammation, Polarization of Microglia and Mediate the Interaction Between Microglia and Glioma?* Front Mol Neurosci 12:125.

H

Hagemeyer N, Hanft KM, Akriditou MA, Unger N, Park ES, Stanley ER, Staszewski O, Dimou L, Prinz M (2017) *Microglia contribute to normal myelinogenesis and to oligodendrocyte progenitor maintenance during adulthood*. Acta Neuropathol 134:441-458.

Halász N (1990) *Morphological basis of information processing in the olfactory bulb*. Schild D 175-190.

Halász N, Johansson O, Hokfelt T, Ljungdahl A, Goldstein M (1981) *Immunohistochemical identification of two types of dopamine neuron in the rat olfactory bulb as seen by serial sectioning*. J Neurocytol 10:251-259.

Hanamsagar R, Alter MD, Block CS, Sullivan H, Bolton JL, Bilbo SD (2017) *Generation of a microglial developmental index in mice and in humans reveals a sex difference in maturation and immune reactivity*. Glia 65:1504-1520.

Handel MA, Dawson M (1981) *Effects on Spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutant, purkinje cell degeneration*. Gamete Res 4:185-192.

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

Harry GJ (2021) *Microglia in Neurodegenerative Events-An Initiator or a Significant Other?* Int J Mol Sci 22:5818.

Hattori Y (2023) *The multifaceted roles of embryonic microglia in the developing brain*. Front Cell Neurosci 17:988952.

Hendrickx DAE, van Eden CG, Schuurman KG, Hamann J, Huitinga I (2017) *Staining of HLA-DR, Iba1 and CD68 in human microglia reveals partially overlapping expression depending on cellular morphology and pathology*. J Neuroimmunol 309:12-22.

Henley SM, Bates GP, Tabrizi SJ (2005) *Biomarkers for neurodegenerative diseases*. Curr Opin Neurol 18:698-705.

Henry RJ, Loane DJ (2021) *Targeting chronic and evolving neuroinflammation following traumatic brain injury to improve long-term outcomes: insights from microglial-depletion models*. Neural Regen Res 16:976-977.

Henry RJ, Ritzel RM, Barrett JP, Doran SJ, Jiao Y, Leach JB, Szeto GL, Wu J, Stoica BA, Faden AI, Loane DJ (2020) *Microglial Depletion with CSF1R Inhibitor During Chronic Phase of Experimental Traumatic Brain Injury Reduces Neurodegeneration and Neurological Deficits*. J Neurosci 40:2960-2974.

Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, Waisman A, Rülcke T, Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A (2005) *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis*. Nat Med 11:146-152.

Bibliografía

- Hernández-Pérez C (2022) *El lóbulo X del cerebelo: análisis génico y molecular de su resistencia a la degeneración neuronal del ratón PCD*. Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca.
- Hernández-Pérez C, Weruaga E, Díaz D (2023) *Lobe X of the Cerebellum: A Natural Neuro-Resistant Region*. *Anatomia* 2:43-62.
- Hernangómez M, Carrillo-Salinas FJ, Mecha M, Correa F, Mestre L, Loría F, Feliú A, Docagne F, Guaza C (2014) *Brain innate immunity in the regulation of neuroinflammation: therapeutic strategies by modulating CD200-CD200R interaction involve the cannabinoid system*. *Curr Pharm Des* 20:4707-4022.
- Hernangómez M, Mestre L, Correa FG, Loría F, Mecha M, Iñigo PM, Docagne F, Williams RO, Borrell J, Guaza C (2012) *CD200-CD200R1 interaction contributes to neuroprotective effects of anandamide on experimentally induced inflammation*. *Glia* 60:1437-1450.
- Hinze A, Stolzing A (2011) *Differentiation of mouse bone marrow derived stem cells toward microglia-like cells*. *BMC Cell Biol* 12:35.
- Hinze A, Stolzing A (2012) *Microglia differentiation using a culture system for the expansion of mice non-adherent bone marrow stem cells*. *J Inflamm* 9:12.
- Hlavaty D, Lechler T (2021) *Roles for microtubules in the proliferative and differentiated cells of stratified epithelia*. *Curr Opin Cell Biol* 68:98-104.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD (2000) *Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200)*. *Science* 290:1768-1771.
- Holloway OG, Canty AJ, King AE, Ziebell JM (2019) *Rod microglia and their role in neurological diseases*. *Semin Cell Dev Biol* 94:96-103.
- Hong S, Dissing-Olesen L, Stevens B (2016) *New insights on the role of microglia in synaptic pruning in health and disease*. *Curr Opin Neurobiol* 36:128-134.
- Hoogland IC, Houbolt C, van Westerloo DJ, van Gool WA, van de Beek D (2015) *Systemic inflammation and microglial activation: systematic review of animal experiments*. *J Neuroinflammation* 12:114.
- Hou B, Jiang C, Wang D, Wang G, Wang Z, Zhu M, Kang Y, Su J, Wei P, Ren H, Ju F (2020) *Pharmacological Targeting of CSF1R Inhibits Microglial Proliferation and Aggravates the Progression of Cerebral Ischemic Pathology*. *Front Cell Neurosci* 14:267.
- Hu B, Duan S, Wang Z, Li X, Zhou Y, Zhang X, Zhang YW, Xu H, Zheng H (2021) *Insights Into the Role of CSF1R in the Central Nervous System and Neurological Disorders*. *Front Aging Neurosci* 13:789834.
- Hughes CE, Nibbs RJB (2018) *A guide to chemokines and their receptors*. *FEBS J* 285:2944-2971.
- I**
- Illes P, Rubini P, Ulrich H, Zhao Y, Tang Y (2020) *Regulation of Microglial Functions by Purinergic Mechanisms in the Healthy and Diseased CNS*. *Cells* 9:1108.
- Imamura F, Ito A, LaFever BJ (2020) *Subpopulations of Projection Neurons in the Olfactory Bulb*. *Front Neural Circuits* 14:561822.
- Ito M (2006) *Cerebellar circuitry as a neuronal machine*. *Prog Neurobiol* 78:272-303.
- J**
- Jackman SL, Chen CH, Offermann HL, Drew IR, Harrison BM, Bowman AM, Flick KM, Flaquer I, Regehr WG (2020) *Cerebellar Purkinje cell activity modulates aggressive behavior*. *Elife* 9:e53229.

Jana M, Palencia CA, Pahan K (2008) *Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease*. J Immunol 181:7254-7262.

Jose S, Tan SW, Ooi YY, Ramasamy R, Vidyadaran S (2014) *Mesenchymal stem cells exert anti-proliferative effect on lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia by reducing tumour necrosis factor- α levels*. J Neuroinflammation 11:149.

Jurga AM, Paleczna M, Kuter KZ (2020) *Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes*. Front Cell Neurosci 14:198.

K

Kaiser T, Feng G (2019) *Tmem119-EGFP and Tmem119-CreERT2 Transgenic Mice for Labeling and Manipulating Microglia*. eNeuro 6:0448.

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

Kanazawa M, Ninomiya I, Hatakeyama M, Takahashi T, Shimohata T (2017) *Microglia and Monocytes/Macrophages Polarization Reveal Novel Therapeutic Mechanism against Stroke*. Int J Mol Sci 18:2135.

Kany S, Vollrath JT, Relja B (2019) *Cytokines in Inflammatory Disease*. Int J Mol Sci 20:6008.

Karakaya M, Paketci C, Altmueller J, Thiele H, Hoelker I, Yis U, Wirth B (2019) *Biallelic variant in AGTPBP1 causes infantile lower motor neuron degeneration and cerebellar atrophy*. Am J Med Genet A 179:1580-1584.

Kaur C, You Y (2000) *Ultrastructure and function of the amoeboid microglial cells in the periventricular white matter in postnatal rat brain following a hypoxic exposure*. Neurosci Lett 290:17-20.

Kerkhofs D, van Hagen BT, Milanova IV, Schell KJ, van Essen H, Wijnands E, Goossens P, Blankesteyn WM, Unger T, Prickaerts J, Biessen EA, van Oostenbrugge RJ, Foulquier S (2020) *Pharmacological depletion of microglia and perivascular macrophages prevents Vascular Cognitive Impairment in Ang II-induced hypertension*. Theranostics 10:9512-9527.

Kershman J (1939) *Genesis of microglia in the human brain*. Arch Neuro. Psychiatry 41:24-50.

Kettenmann H, Kirchhoff F, Verkhratsky A (2013) *Microglia: new roles for the synaptic stripper*. Neuron 77:10-18.

Kim N, Xiao R, Choi H, Jo H, Kim JH, Uhm SJ, Park C (2011) *Abnormal sperm development in pcd(3J)^{-/-} mice: the importance of Agtppb1 in spermatogenesis*. Mol Cells 31:39-48.

Kobashi S, Terashima T, Katagi M, Urushitani M, Kojima H (2022) *Bone marrow-derived inducible microglia-like cells ameliorate motor function and survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. Cytotherapy 24:789-801.

Kobayashi H, Cheveralls KC, Leonetti MD, Royer LA (2022) *Self-supervised deep learning encodes high-resolution features of protein subcellular localization*. Nat Methods 19:995-1003.

Köhler C (2007) *Allograft inflammatory factor-1/Ionized calcium-binding adapter molecule 1 is specifically expressed by most subpopulations of macrophages and spermatids in testis*. Cell Tissue Res 330:291-302.

Komiya H, Takeuchi H, Ogawa Y, Hatooka Y, Takahashi K, Katsumoto A, Kubota S, Nakamura H, Kunii M, Tada M, Doi H, Tanaka F (2020) *CCR2 is localized in microglia and neurons, as well as infiltrating monocytes, in the lumbar spinal cord of ALS mice*. Mol Brain 13:64.

Bibliografía

Kosaka M, Lee JM, Yang GJ, Matsumoto T, Tsuchiya K, Ohwatari N, Shimazu M (1994) *The Role of Heat Shock Proteins (HSPs) and Interleukin-1 Interaction in Suppression of Fever*. In: Milton, AS (eds) *Temperature Regulation*. Advances in Pharmacological Sciences. Birkhäuser, Basel.

Kotwica-Mojzych K, Jodłowska-Jędrych B, Mojzych M (2021) *CD200:CD200R Interactions and Their Importance in Immunoregulation*. *Int J Mol Sci* 22:1602.

Kumar A, Ratan RR (2016) *Oxidative Stress and Huntington's Disease: The Good, The Bad, and The Ugly*. *J Huntingtons Dis* 5:217-237.

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

L

Lago N, Pannunzio B, Amo-Aparicio J, López-Vales R, Peluffo H (2018) *CD200 modulates spinal cord injury neuroinflammation and outcome through CD200R1*. *Brain Behav Immun* 73:416-426.

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

Lalancette-Hébert M, Faustino J, Thammisetty SS, Chip S, Vexler ZS, Kriz J (2017) *Live imaging of the innate immune response in neonates reveals differential TLR2 dependent activation patterns in sterile inflammation and infection*. *Brain Behav Immun* 65:312-327.

Lalancette-Hébert M, Phaneuf D, Soucy G, Weng YC, Kriz J (2009) *Live imaging of Toll-like receptor 2 response in cerebral ischaemia reveals a role of olfactory bulb microglia as modulators of inflammation*. *Brain* 132:940-954.

Lalonde R, Strazielle C (2022) *The AGTPBP1 gene in neurobiology*. *Gene* 809:146001.

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

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

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

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) *Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain*. *Neuroscience* 39:151-170.

Leal MC, Casabona JC, Puntel M, Pitossi FJ (2013) *Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α : reliable targets for protective therapies in Parkinson's Disease?* *Front Cell Neurosci* 7:53.

Lee JK, Tansey MG (2013) *Microglia isolation from adult mouse brain*. *Methods Mol Biol* 1041:17-23.

Lei F, Cui N, Zhou C, Chodosh J, Vavvas DG, Paschalis EI (2020) *CSF1R inhibition by a small-molecule inhibitor is not microglia specific, affecting hematopoiesis and the function of macrophages*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:23336-23338.

Li E, Chung H, Kim Y, Kim DH, Ryu JH, Sato T, Kojima M, Park S (2013) *Ghrelin directly stimulates adult hippocampal neurogenesis: implications for learning and memory*. *Endocr J* 60:781-9.

Li Y, Ritzel RM, Khan N, Cao T, He J, Lei Z, Matyas JJ, Sabirzhanov B, Liu S, Li H, Stoica BA, Loane DJ, Faden AI, Wu J (2020) *Delayed microglial depletion after spinal cord injury reduces chronic inflammation and*

neurodegeneration in the brain and improves neurological recovery in male mice. *Theranostics* 10:11376-11403.

Lier J, Streit WJ, Bechmann I (2021) *Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes*. *Cells* 10:2236.

Lier J, Winter K, Bleher J, Grammig J, Mueller WC, Streit W, Bechmann I (2019) *Loss of IBA1-Expression in brains from individuals with obesity and hepatic dysfunction*. *Brain Res* 1710:220-229.

Ling EA (1979) *Transformation of monocytes into amoeboid microglia in the corpus callosum of postnatal rats, as shown by labelling monocytes by carbon particles*. *J Anat* 128:847-858.

Lituma PJ, Woo E, O'Hara BF, Castillo PE, Sibinga NES, Nandi S (2021) *Altered synaptic connectivity and brain function in mice lacking microglial adapter protein Iba1*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118:e2115539118.

Liu LR, Liu JC, Bao JS, Bai QQ, Wang GQ (2020) *Interaction of Microglia and Astrocytes in the Neurovascular Unit*. *Front Immunol* 11:1024.

Lois C, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A (1996) *Chain migration of neuronal precursors*. *Science* 271:978-981.

Lund H, Pieber M, Harris RA (2017) *Lessons Learned about Neurodegeneration from Microglia and Monocyte Depletion Studies*. *Front Aging Neurosci* 9:234.

Luo D, Wan X, Liu J, Tong T (2018) *Optimally estimating the sample mean from the sample size, median, mid-range, and/or mid-quartile range*. *Stat Methods Med Res* 27:1785-1805.

M

Ma CL, Ma XT, Wang JJ, Liu H, Chen YF, Yang Y (2017) *Physical exercise induces hippocampal neurogenesis and prevents cognitive decline*. *Behav Brain Res* 317:332-339.

Magnus T, Chan A, Savill J, Toyka KV, Gold R (2002) *Phagocytotic removal of apoptotic, inflammatory lymphocytes in the central nervous system by microglia and its functional implications*. *J Neuroimmunol* 130:1-9.

Manich G, Recasens M, Valente T, Almolda B, González B, Castellano B (2019) *Role of the CD200-CD200R Axis During Homeostasis and Neuroinflammation*. *Neuroscience* 405:118-136.

Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD (2016) *The Role of Reactive Oxygen Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Huntington's Disease: A Mini Review*. *Oxid Med Cell Longev* 2016:8590578.

Manto M, Bower JM, Conforto AB, Delgado-García JM, da Guarda SN, Gerwig M, Habas C, Hagura N, Ivry RB, Mariën P, Molinari M, Naito E, Nowak DA, Oulad Ben Taib N, Pelisson D, Tesche CD, Tilikete C, Timmann D (2012) *Consensus paper: roles of the cerebellum in motor control--the diversity of ideas on cerebellar involvement in movement*. *Cerebellum* 11:457-487.

Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M (2013) *Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling*. *J Pathol* 229:176-185.

Marchena M, Lara J, Aijón J, Germain F, de la Villa P, Velasco A (2011) *The retina of the PCD/PCD mouse as a model of photoreceptor degeneration. A structural and functional study*. *Exp Eye Res* 93:607-617.

Marín-Teva JL, Dusart I, Colin C, Gervais A, van Rooijen N, Mallat M (2004) *Microglia promote the death of developing Purkinje cells*. *Neuron* 41:535-547.

Bibliografía

Matejuk A, Ransohoff RM (2020) *Crosstalk Between Astrocytes and Microglia: An Overview*. Front Immunol 11:1416.

Matzinger P, Kamala T (2011) *Tissue-based class control: the other side of tolerance*. Nat Rev Immunol 11:221-230.

Mayoral-Palarz K, Neves-Carvalho A, Duarte-Silva S, Monteiro-Fernandes D, Maciel P, Khodakhah K (2022) *Cerebellar neuronal dysfunction accompanies early motor symptoms in spinocerebellar ataxia type 3*. Dis Model Mech 15:dmm049514.

McNamara NB, Munro DAD, Bestard-Cuche N, Uyeda A, Bogie JFJ, Hoffmann A, Holloway RK, Molina-Gonzalez I, Askew KE, Mitchell S, Mungall W, Dodds M, Dittmayer C, Moss J, Rose J, Szymkowiak S, Amann L, McColl BW, Prinz M, Spires-Jones TL, Stenzel W, Horsburgh K, Hendriks JJA, Pridans C, Muramatsu R, Williams A, Priller J, Miron VE (2023) *Microglia regulate central nervous system myelin growth and integrity*. Nature 613:120-129.

Mendes MS, Le L, Atlas J, Brehm Z, Ladron-de-Guevara A, Matei E, Lamantia C, McCall MN, Majewska AK (2021) *The role of P2Y₁₂ in the kinetics of microglial self-renewal and maturation in the adult visual cortex in vivo*. Elife 10:e61173.

Mercurio D, Fumagalli S, Schafer MK, Pedragosa J, Ngassam LDC, Wilhelmi V, Winterberg S, Planas AM, Weihe E, De Simoni MG (2022) *Protein Expression of the Microglial Marker Tmem119 Decreases in Association With Morphological Changes and Location in a Mouse Model of Traumatic Brain Injury*. Front Cell Neurosci 16:820127.

Miall RC (2013) *Cerebellum: Anatomy and Function in Neuroscience in the 21st Century: From Basic to Clinical*. Pfaff DW 1149-1167. Springer New York.

Michalski D, Pitsch R, Pillai DR, Mages B, Aleithe S, Grosche J, Martens H, Schlachetzki F, Härtig W (2017) *Delayed histochemical alterations within the neurovascular unit due to transient focal cerebral ischemia and experimental treatment with neurotrophic factors*. PLoS One 12:e0174996.

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

Milner R, Campbell IL (2002) *Cytokines regulate microglial adhesion to laminin and astrocyte extracellular matrix via protein kinase C-dependent activation of the alpha6beta1 integrin*. J Neurosci 22:1562-1572.

Möller K, Brambach M, Villani A, Gallo E, Gilmour D, Peri F (2022) *A role for the centrosome in regulating the rate of neuronal efferocytosis by microglia in vivo*. Elife 11:e82094.

Monif M, Reid CA, Powell KL, Drummond KJ, O'Brien TJ, Williams DA (2016) *Interleukin-1 β has trophic effects in microglia and its release is mediated by P2X₇R pore*. J Neuroinflammation 13:173.

Montilla A, Zabala A, Matute C, Domercq M (2020) *Functional and Metabolic Characterization of Microglia Culture in a Defined Medium*. Front Cell Neurosci 14:22.

Morrison H, Filosa JA (2013) *A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion*. J Neuroinflammation 10:4.

Morrison H, Young K, Qureshi M, Rowe RK, Lifshitz J (2017) *Quantitative microglia analyses reveal diverse morphologic responses in the rat cortex after diffuse brain injury*. Sci Rep 7:13211.

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

Muñoz-Castañeda R, Díaz D, Peris L, Andrieux A, Bosc C, Muñoz-Castañeda JM, Janke C, Alonso JR, Moutin MJ, Weruaga E (2018) *Cytoskeleton stability is essential for the integrity of the cerebellum and its motor- and affective-related behaviors*. *Sci Rep* 8:3072.

Muroyama A, Lechler T (2017) *Microtubule organization, dynamics and functions in differentiated cells*. *Development* 144:3012-3021.

N

Nagayama S, Homma R, Imamura F (2014) *Neuronal organization of olfactory bulb circuits*. *Front Neural Circuits* 8:98.

Nayak D, Roth TL, McGavern DB (2014) *Microglia development and function*. *Annu Rev Immunol* 32:367-402.

Nebeling FC, Poll S, Justus LC, Steffen J, Keppler K, Mittag M, Fuhrmann M (2023) *Microglial motility is modulated by neuronal activity and correlates with dendritic spine plasticity in the hippocampus of awake mice*. *Elife* 12:83176.

Neher JJ, Neniskyte U, Brown GC (2012) *Primary phagocytosis of neurons by inflamed microglia: potential roles in neurodegeneration*. *Front Pharmacol* 3:27.

Neumann P, Lenz DE, Streit WJ, Bechmann I (2023) *Is microglial dystrophy a form of cellular senescence? An analysis of senescence markers in the aged human brain*. *Glia* 71:377-390.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) *Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo*. *Science* 308:1314-1318.

Nuzzo D, Picone P, Caruana L, Vasto S, Barera A, Caruso C, Di Carlo M (2014) *Inflammatory mediators as biomarkers in brain disorders*. *Inflammation* 37:639-648.

O

Oberland S, Neuhaus EM (2014) *Whole mount labeling of cilia in the main olfactory system of mice*. *J Vis Exp* 94:52299.

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

Oria M, Figueira RL, Scorletti F, Sbragia L, Owens K, Li Z, Pathak B, Corona MU, Marotta M, Encinas JL, Peiro JL (2018) *CD200-CD200R imbalance correlates with microglia and pro-inflammatory activation in rat spinal cords exposed to amniotic fluid in retinoic acid-induced spina bifida*. *Sci Rep* 8:10638.

Orr AG, Orr AL, Li XJ, Gross RE, Traynelis SF (2009) *Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction*. *Nat Neurosci* 12:872-878.

Osorno T, Rudolph S, Nguyen T, Kozareva V, Nadaf NM, Norton A, Macosko EZ, Lee WA, Regehr WG (2022) *Candelabrum cells are ubiquitous cerebellar cortex interneurons with specialized circuit properties*. *Nat Neurosci* 25:702-713.

Ousta A, Piao L, Fang YH, Vera A, Nallamotheu T, Garcia AJ 3rd, Sharp WW (2022) *Microglial Activation and Neurological Outcomes in a Murine Model of Cardiac Arrest*. *Neurocrit Care* 36:61-70.

P

Paasila PJ, Davies DS, Kril JJ, Goldsbury C, Sutherland GT (2019) *The relationship between the morphological subtypes of microglia and Alzheimer's disease neuropathology*. *Brain Pathol* 29:726-740.

Bibliografía

Pang B, Araki A, Zhou L, Takebayashi H, Harada T, Kadota K (2023) *CCP1, a Regulator of Tubulin Post-Translational Modifications, Potentially Plays an Essential Role in Cerebellar Development*. *Int J Mol Sci* 24:5335.

Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay ME, Aguzzi A, Ajami B, Amit I, Audinat E, Bechmann I, Bennett M, Bennett F, Bessis A, Biber K, Bilbo S, Blurton-Jones M, Boddeke E, Brites D, Brône B, Brown GC, Butovsky O, Carson MJ, Castellano B, Colonna M, Cowley SA, Cunningham C, Davalos D, De Jager PL, de Strooper B, Denes A, Eggen BJL, Eyo U, Galea E, Garel S, Ginhoux F, Glass CK, Gokce O, Gomez-Nicola D, González B, Gordon S, Graeber MB, Greenhalgh AD, Gressens P, Greter M, Gutmann DH, Haass C, Heneka MT, Heppner FL, Hong S, Hume DA, Jung S, Kettenmann H, Kipnis J, Koyama R, Lemke G, Lynch M, Majewska A, Malcangio M, Malm T, Mancuso R, Masuda T, Matteoli M, McColl BW, Miron VE, Molofsky AV, Monje M, Mracsko E, Nadjar A, Neher JJ, Neniskyte U, Neumann H, Noda M, Peng B, Peri F, Perry VH, Popovich PG, Pridans C, Priller J, Prinz M, Ragozzino D, Ransohoff RM, Salter MW, Schaefer A, Schafer DP, Schwartz M, Simons M, Smith CJ, Streit WJ, Tay TL, Tsai LH, Verkhratsky A, von Bernhardi R, Wake H, Wittamer V, Wolf SA, Wu LJ, Wyss-Coray T (2022) *Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads*. *Neuron* 110:3458-3483.

Parakalan R, Jiang B, Nimmi B, Janani M, Jayapal M, Lu J, Tay SS, Ling EA, Dheen ST (2012) *Transcriptome analysis of amoeboid and ramified microglia isolated from the corpus callosum of rat brain*. *BMC Neurosci* 14:13-64.

Park JS, Kam TI, Lee S, Park H, Oh Y, Kwon SH, Song JJ, Kim D, Kim H, Jhaldiyal A, Na DH, Lee KC, Park EJ, Pomper MG, Pletnikova O, Troncoso JC, Ko HS, Dawson VL, Dawson TM, Lee S (2021) *Blocking microglial activation of reactive astrocytes is neuroprotective in models of Alzheimer's disease*. *Acta Neuropathol Commun* 9:78.

Parkhurst CN, Gan WB (2010) *Microglia dynamics and function in the CNS*. *Curr Opin Neurobiol* 20:595-600.

Parkhurst CN, Yang G, Ninan I, Savas JN, Yates JR 3rd, Lafaille JJ, Hempstead BL, Littman DR, Gan WB (2013) *Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor*. *Cell* 155:1596-1609.

Parnaik R, Raff MC, Scholes J (2000) *Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes*. *Curr Biol* 10:857-860.

Paasila PJ, Davies DS, Kril JJ, Goldsbury C, Sutherland GT (2019) *The relationship between the morphological subtypes of microglia and Alzheimer's disease neuropathology*. *Brain Pathol* 29:726-740.

Pawelec P, Ziemka-Nalecz M, Sypecka J, Zalewska T (2020) *The Impact of the CX3CL1/CX3CR1 Axis in Neurological Disorders*. *Cells* 9:2277.

Penfield W (1925) *Microglia and the Process of Phagocytosis in Gliomas*. *Am J Pathol* 1:77-90.

Pereira C, Francis-Oliveira J, Singulani MP, Ferreira AF, Britto LR (2023) *Microglial depletion exacerbates motor impairment and dopaminergic neuron loss in a 6-OHDA model of Parkinson's disease*. *J Neuroimmunol* 375:57801.

Pérez-Boyeró D, Hernández-Pérez C, Valero J, Cabedo VL, Alonso JR, Díaz D, Weruaga E (2023) *The eNOS isoform exhibits increased expression and activation in the main olfactory bulb of nNOS knock-out mice*. *Front Cell Neurosci* 17:1120836.

Pérez-Martín E (2022) *Terapia celular combinada con el fármaco neuroprotector n-oleiletanolamina en un modelo murino de degeneración neuronal selectiva*. Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca.

Pérez-Martín E, Muñoz-Castañeda R, Moutin MJ, Ávila-Zarza CA, Muñoz-Castañeda JM, Del Pilar C, Alonso JR, Andrieux A, Díaz D, Weruaga E (2021) *Oleylethanolamide Delays the Dysfunction and Death of*

Purkinje Cells and Ameliorates Behavioral Defects in a Mouse Model of Cerebellar Neurodegeneration. Neurotherapeutics 18:1748-1767.

Pérez-Martín E, Pérez-Revuelta L, Barahona-López C, Pérez-Boyeró D, Alonso JR, Díaz D, Weruaga E (2023) *Oleoylethanolamide Treatment Modulates Both Neuroinflammation and Microgliosis, and Prevents Massive Leukocyte Infiltration to the Cerebellum in a Mouse Model of Neuronal Degeneration. Int J Mol Sci* 24:9691.

Pérez-Revuelta L (2023) *Factores neurotróficos y su efecto neuroprotector en un modelo murino de degeneración neuronal selectiva. Tesis Doctoral de la Universidad de Salamanca.*

Peterson LJ, Flood PM (2012) *Oxidative stress and microglial cells in Parkinson's disease. Mediators Inflamm* 2012:401264.

Pettit LK, Varsanyi C, Tadros J, Vassiliou E (2013) *Modulating the inflammatory properties of activated microglia with Docosahexaenoic acid and Aspirin. Lipids Health Dis* 12:16.

Piccinini AM, Midwood KS (2010) *DAMPening inflammation by modulating TLR signalling. Mediators Inflamm* 2010:672395.

Pinching AJ, Powell TP (1971) *The neuron types of the glomerular layer of the olfactory bulb. J Cell Sci* 9:305-345.

Popa LS, Ebner TJ (2019) *Cerebellum, Predictions and Errors. Front Cell Neurosci* 12:524.

Pósfai B, Cserép C, Orsolits B, Dénes Á (2019) *New Insights into Microglia-Neuron Interactions: A Neuron's Perspective. Neurosci* 405:103-117.

Price JL y Sprich WW (1975) *Observation on the lateral olfactory tract of the rat. J Comp Neurol* 162:321-336.

Prowse N, Hayley S (2021) *Microglia and BDNF at the crossroads of stressor related disorders: Towards a unique trophic phenotype. Neurosci Biobehav Rev* 31:135-163.

Q

Qiu Y, Shen X, Xu H (2023) *Editorial: Microglia and peripheral immune cells in aging and neurodegenerative diseases. Front Cell Dev Biol* 11:1178496.

R

Ramadan YH, Gu A, Ross N, McEwan SA, Barr MM, Firestein BL, O'Hagan R (2021) *CCP1, a Tubulin Deglutamylase, Increases Survival of Rodent Spinal Cord Neurons following Glutamate-Induced Excitotoxicity. eNeuro* 8:0431.

Rauchmann BS, Brendel M, Franzmeier N, Trappmann L, Zaganjori M, Ersoezlue E, Morenas-Rodríguez E, Guersel S, Burow L, Kurz C, Haeckert J, Tatò M, Utecht J, Papazov B, Pogarell O, Janowitz D, Buerger K, Ewers M, Palleis C, Weidinger E, Biechele G, Schuster S, Finze A, Eckenweber F, Rupprecht R, Rominger A, Goldhardt O, Grimmer T, Keeser D, Stoecklein S, Dietrich O, Bartenstein P, Levin J, Höglinger G, Perneczky R (2022) *Microglial Activation and Connectivity in Alzheimer Disease and Aging. Ann Neurol* 92:768-781.

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

Recio JS, Álvarez-Dolado M, Díaz D, Baltanás FC, Piquer-Gil M, Alonso JR, Weruaga E (2011) *Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity. Cell Transplant* 20:1179-1192.

Bibliografía

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

Reeber SL, Otis TS, Sillitoe RV (2013) *New roles for the cerebellum in health and disease*. Front Syst Neurosci 7:83.

Río-Hortega, P (1919) *El "tercer elemento" de los centros nerviosos. I. La microglía en estado normal*. Boletín de la Sociedad Española de Biología 9:68-82.

Riquier AJ, Sollars SI (2020) *Astrocytic response to neural injury is larger during development than in adulthood and is not predicated upon the presence of microglia*. BBI - Health 1:2666-3546.

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

Rogowski K, van Dijk J, Magiera MM, Bosc C, Deloulme JC, Bosson A, Peris L, Gold ND, Lacroix B, Bosch Grau M, Bec N, Larroque C, Desagher S, Holzer M, Andrieux A, Moutin MJ, Janke C (2010) *A family of protein-deglutamylation enzymes associated with neurodegeneration*. Cell 143:564-578.

Rosito M, Sanchini C, Gosti G, Moreno M, De Panfilis S, Giubettini M, Debellis D, Catalano F, Peruzzi G, Marotta R, Indrieri A, De Leonibus E, De Stefano ME, Ragozzino D, Ruocco G, Di Angelantonio S, Bartolini F (2023) *Microglia reactivity entails microtubule remodeling from acentrosomal to centrosomal arrays*. Cell Rep 42:112104.

Rossi C, Cusimano M, Zambito M, Finardi A, Capotondo A, Garcia-Manteiga JM, Comi G, Furlan R, Martino G, Muzio L (2018) *Interleukin 4 modulates microglia homeostasis and attenuates the early slowly progressive phase of amyotrophic lateral sclerosis*. Cell Death Dis 9:250.

Ruijtenberg S, van den Heuvel S (2016) *Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression*. Cell Cycle 15:196-212.

Russel WMS, Burch RL (1959) *The principles of humane experimental technique*. London Methuen and Co.

S

Sakamoto M, Kageyama R, Imayoshi I (2014) *The functional significance of newly born neurons integrated into olfactory bulb circuits*. Front Neurosci 8:121.

Santos EN, Fields RD (2021) *Regulation of myelination by microglia*. Sci Adv 7:eabk1131.

Sathyanesan A, Zhou J, Scafidi J, Heck DH, Sillitoe RV, Gallo V (2019) *Emerging connections between cerebellar development, behaviour and complex brain disorders*. Nat Rev Neurosci 20:298-313.

Satoh M, Stevens B, Judt F, Khairoutdinov M, Lin SJ, Putman WM, Düben, Peter G (2019) *Cloud-Resolving Models*. Curr Clim Change Rep 5:172-184.

Savchenko VL, Nikonenko IR, Skibo GG, McKanna JA (1997) *Distribution of microglia and astrocytes in different regions of the normal adult rat brain*. Neurophysiol 29: 343-351.

Sekirnjak C, Vissel B, Bollinger J, Faulstich M, du Lac S (2003) *Purkinje cell synapses target physiologically unique brainstem neurons*. J Neurosci 23:6392-6398.

Servet-Delprat C, Arnaud S, Jurdic P, Nataf S, Grasset MF, Soulas C, Domenget C, Destaing O, Rivollier A, Perret M, Dumontel C, Hanau D, Gilmore GL, Belin MF, Rabourdin-Combe C, Mouchiroud G (2002) *Flt3+ macrophage precursors commit sequentially to osteoclasts, dendritic cells and microglia*. BMC Immunol 3:15.

- Shahidehpour RK, Higdon RE, Crawford NG, Neltner JH, Ighodaro ET, Patel E, Price D, Nelson PT, Bachstetter AD (2021) *Dystrophic microglia are associated with neurodegenerative disease and not healthy aging in the human brain*. *Neurobiol Aging* 99:19-27.
- Shapiro SL (2009) *The integration of mindfulness and psychology*. *J Clin Psychol* 65:555-560.
- Shashi V, Magiera MM, Klein D, Zaki M, Schoch K, Rudnik-Schöneborn S, Norman A, Lopes Abath Neto O, Dusl M, Yuan X, Bartesaghi L, De Marco P, Alfares AA, Marom R, Arold ST, Guzmán-Vega FJ, Pena LD, Smith EC, Steinlin M, Babiker MO, Mohassel P, Foley AR, Donkervoort S, Kaur R, Ghosh PS, Stanley V, Musaev D, Nava C, Mignot C, Keren B, Scala M, Tassano E, Picco P, Doneda P, Fiorillo C, Issa MY, Alassiri A, Alahmad A, Gerard A, Liu P, Yang Y, Ertl-Wagner B, Kranz PG, Wentzensen IM, Stucka R, Stong N, Allen AS, Goldstein DB; Undiagnosed Diseases Network; Schoser B, Rösler KM, Alfadhel M, Capra V, Chrast R, Strom TM, Kamsteeg EJ, Bönnemann CG, Gleeson JG, Martini R, Janke C, Senderek J (2018) *Loss of tubulin deglutamylase CCP1 causes infantile-onset neurodegeneration*. *EMBO J* 37:e100540.
- Schmidt AW, Bodznick D (1987) *Afferent and efferent connections of the vestibulolateral cerebellum of the little skate, Raja erinacea*. *Brain Behav Evol* 30:282-302.
- Schneider SP, Macrides F (1978) *Laminar distributions of interneurons in the main olfactory bulb of the adult hamster*. *Brain Res Bull* 3:73-82.
- Sheffer R, Gur M, Brooks R, Salah S, Daana M, Fraenkel N, Eisenstein E, Rabie M, Nevo Y, Jalas C, Elpeleg O, Edvardson S, Harel T (2019) *Biallelic variants in AGTPBP1, involved in tubulin deglutamylation, are associated with cerebellar degeneration and motor neuropathy*. *Eur J Hum Genet* 27:1419-1426.
- Shepherd GM (1972) *Synaptic organization of the mammalian olfactory bulb*. *Physiol Rev* 52:864-917.
- Shipley MT, Ennis M, Puche A (2004) *The olfactory system. The rat nervous system*. Paxinos G, editor. New York: Academic Press 923-964.
- Sierra A, de Castro F, Del Río-Hortega J, Rafael Iglesias-Rozas J, Garrosa M, Kettenmann H (2016) *The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pío del Río-Hortega 1919 series of papers on microglia*. *Glia* 64:1801-1840.
- Sierra A, Encinas JM, Deudero JJ, Chancey JH, Enikolopov G, Overstreet-Wadiche LS, Tsirka SE, Maletic-Savatic M (2010) *Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis*. *Cell Stem Cell* 7:483-495.
- Sierra A, Paolicelli RC, Kettenmann H (2019) *Cien Años de Microglía: Milestones in a Century of Microglial Research*. *Trends Neurosci* 42:778-792.
- Sillitoe RV, Joyner AL (2007) *Morphology, molecular codes, and circuitry produce the three-dimensional complexity of the cerebellum*. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23:549-577.
- Simpson DSA, Oliver PL (2020) *ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease*. *Antioxidants* 9:743.
- Šišková Z, Tremblay MÈ (2013) *Microglia and synapse: interactions in health and neurodegeneration*. *Neural Plast* 2013:425845.
- Sosna J, Philipp S, Albay R, Reyes-Ruiz JM, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM, Glabe CG (2018) *Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease*. *Mol Neurodegener* 13:11.
- Soudry Y, Lemogne C, Malinvaud D, Consoli SM, Bonfils P (2011) *Olfactory system and emotion: common substrates*. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 128:18-23.

Bibliografía

Sowa JE, Tokarski K (2021) *Cellular, synaptic, and network effects of chemokines in the central nervous system and their implications to behavior*. *Pharmacol Rep* 73:1595-1625.

Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crapser J, Zhang J, Burton EA, Zhang Y, Spevak W, Lin J, Phan NY, Habets G, Rymar A, Tsang G, Walters J, Nespi M, Singh P, Broome S, Ibrahim P, Zhang C, Bollag G, West BL, Green KN (2019) *Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model*. *Nat Commun* 10:3758.

Squarzoni P, Oller G, Hoeffel G, Pont-Lezica L, Rostaing P, Low D, Bessis A, Ginhoux F, Garel S (2014) *Microglia modulate wiring of the embryonic forebrain*. *Cell Rep* 8:1271-1279.

Stansley B, Post J, Hensley K (2012) *A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease*. *J Neuroinflammation*. 2012 9:115.

Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG (1997) *Biology and action of colony-stimulating factor-1*. *Mol Reprod Dev* 46:4-10.

Stoessel MB, Majewska AK (2021) *Little cells of the little brain: microglia in cerebellar development and function*. *Trends Neurosci* 44:564-578.

Stojiljkovic MR, Schmeer C, Witte OW (2022) *Pharmacological Depletion of Microglia Leads to a Dose-Dependent Reduction in Inflammation and Senescence in the Aged Murine Brain*. *Neurosci* 488:1-9.

Stoodley CJ, Schmähmann JD (2010) *Evidence for topographic organization in the cerebellum of motor control versus cognitive and affective processing*. *Cortex* 46:831-844.

Stowell RD, Wong EL, Batchelor HN, Mendes MS, Lamantia CE, Whitelaw BS, Majewska AK (2018) *Cerebellar microglia are dynamically unique and survey Purkinje neurons in vivo*. *Dev Neurobiol* 78:627-644.

Sumpter TL, Packiam V, Turnquist HR, Castellaneta A, Yoshida O, Thomson AW (2011) *DAP12 promotes IRAK-M expression and IL-10 production by liver myeloid dendritic cells and restrains their T cell allostimulatory ability*. *J Immunol* 186:1970-1980.

Sun AY, Wang Q, Simonyi A, Sun GY (2010) *Resveratrol as a therapeutic agent for neurodegenerative diseases*. *Mol Neurobiol* 2010 41:375-383.

Swanson KS, Gibson GR, Hutkins R, Reimer RA, Reid G, Verbeke K, Scott KP, Holscher HD, Azad MB, Delzenne NM, Sanders ME (2020) *The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 17:687-701.

Szepesi Z, Manouchehrian O, Bachiller S, Deierborg T (2018) *Bidirectional Microglia-Neuron Communication in Health and Disease*. *Front Cell Neurosci* 12:323.

T

Takahashi K, Yamamura F, Naito M (1989) *Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study*. *J Leukoc Biol* 45:87-96.

Takeuchi O, Akira S (2010) *Pattern recognition receptors and inflammation*. *Cell* 140:805-820.

Tan YL, Yuan Y, Tian L (2020) *Microglial regional heterogeneity and its role in the brain*. *Mol Psychiatry* 25:351-367.

Tanaka S, Ohgidani M, Hata N, Inamine S, Sagata N, Shirouzu N, Mukae N, Suzuki SO, Hamasaki H, Hatae R, Sangatsuda Y, Fujioka Y, Takigawa K, Funakoshi Y, Iwaki T, Hosoi M, Iihara K, Mizoguchi M, Kato TA (2021) *CD206 Expression in Induced Microglia-Like Cells From Peripheral Blood as a Surrogate Biomarker for the Specific Immune Microenvironment of Neurosurgical Diseases Including Glioma*. *Front Immunol* 12:670131.

Tara E, Vitenzon A, Hess E, Khodakhah K (2018) *Aberrant cerebellar Purkinje cell activity as the cause of motor attacks in a mouse model of episodic ataxia type 2*. *Dis Model Mech* 11:dmm034181.

Taylor SE, Morganti-Kossmann C, Lifshitz J, Ziebell JM (2014) *Rod microglia: a morphological definition*. *PLoS One* 9:e97096.

Tong CK, Vidyadaran S (2016) *Role of microglia in embryonic neurogenesis*. *Exp Biol Med* 241:1669-1675.

Tremblay MÈ, Lecours C, Samson L, Sánchez-Zafra V, Sierra A (2015) *From the Cajal alumni Achúcarro and Río-Hortega to the rediscovery of never-resting microglia*. *Front Neuroanat* 9:45.

Tremblay MÈ, Lowery RL, Majewska AK (2010) *Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience*. *PLoS Biol* 8:e1000527.

Triarhou LC (1998) *Rate of neuronal fallout in a transsynaptic cerebellar model*. *Brain Res Bull* 47:219-222.

Triarhou LC, Ghetti B (1991) *Stabilisation of neurone number in the inferior olivary complex of aged 'Purkinje cell degeneration' mutant mice*. *Acta Neuropathol* 81:597-602.

Triarhou LC, Norton J, Ghetti B (1987) *Anterograde transsynaptic degeneration in the deep cerebellar nuclei of Purkinje cell degeneration (pcd) mutant mice*. *Exp Brain Res* 66:577-588.

Tsyglakova M, Huskey AM, Hurst EH, Telep NM, Wilding MC, Babington ME, Rainville JR, Hodes GE (2021) *Sex and region-specific effects of variable stress on microglia morphology*. *Brain Behav Immun Health* 18:100378.

U

Uribe-Querol E, Rosales C (2020) *Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process*. *Front Immunol* 11:1066.

V

Valero J, Berciano MT, Weruaga E, Lafarga M, Alonso JR (2006) *Pre-neurodegeneration of mitral cells in the pcd mutant mouse is associated with DNA damage, transcriptional repression, and reorganization of nuclear speckles and Cajal bodies*. *Mol Cell Neurosci* 33:283-295.

Valero J, Weruaga E, Murias AR, Recio JS, Curto GG, Gómez C, Alonso JR (2007) *Changes in cell migration and survival in the olfactory bulb of the pcd/pcd mouse*. *Dev Neurobiol* 67:839-859.

Valverde F (2003) *El bulbo olfativo: un modelo para estudios experimentales [The olfactory bulb as a model for experimental studies]*. *Neurologia* 18:177-186.

Van der Heijden ME, Lackey EP, Perez R, İşleyen FS, Brown AM, Donofrio SG, Lin T, Zoghbi HY, Sillitoe RV (2021) *Maturation of Purkinje cell firing properties relies on neurogenesis of excitatory neurons*. *Elife* 10:e68045.

Verkhatsky A, Sun D, Tanaka J (2021) *Snapshot of microglial physiological functions*. *Neurochem Int* 144:104960.

Vezzani A, Aronica E, Mazarati A, Pittman QJ (2013) *Epilepsy and brain inflammation*. *Exp Neurol* 244:11-21.

Bibliografía

Vidal-Itriago A, Radford RAW, Aramideh JA, Maurel C, Scherer NM, Don EK, Lee A, Chung RS, Graeber MB, Morsch M (2022) *Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS*. *Front Immunol* 13:997786.

Vijaya AK, Iešmantaitė M, Mela V, Baltriukienė D, Burokas A (2023) *Microglia isolation from aging mice for cell culture: A beginner's guide*. *Front Cell Neurosci* 17:1082180.

Voogd J, Glickstein M (1998) *The anatomy of the cerebellum*. *Trends Neurosci* 21:370-375.

Vožeh F (2015) *Jan Evangelista Purkyně and the cerebellum then and now*. *Physiol Res* 64:567-584.

W

Wallace J, Lord J, Dissing-Olesen L, Stevens B, Murthy VN (2020) *Microglial depletion disrupts normal functional development of adult-born neurons in the olfactory bulb*. *Elife* 9:e50531.

Walter JT, Alviña K, Womack MD, Chevez C, Khodakhah K (2006) *Decreases in the precision of Purkinje cell pacemaking cause cerebellar dysfunction and ataxia*. *Nat Neurosci* 9:389-397.

Wang T, Morgan JI (2007) *The Purkinje cell degeneration (pcd) mouse: an unexpected molecular link between neuronal degeneration and regeneration*. *Brain Res* 1140:26-40.

Wang XJ, Zhang S, Yan ZQ, Zhao YX, Zhou HY, Wang Y, Lu GQ, Zhang JD (2011) *Impaired CD200-CD200R-mediated microglia silencing enhances midbrain dopaminergic neurodegeneration: roles of aging, superoxide, NADPH oxidase, and p38 MAPK*. *Free Radic Biol Med* 50:1094-1106.

Warden AS, Han C, Hansen E, Trescott S, Nguyen C, Kim R, Schafer D, Johnson A, Wright M, Ramirez G, Lopez-Sanchez M, Coufal NG (2023) *Tools for studying human microglia: In vitro and in vivo strategies*. *Brain Behav Immun* 107:369-382.

Wes PD, Sayed FA, Bard F, Gan L (2016) *Targeting microglia for the treatment of Alzheimer's Disease*. *Glia* 64:1710-1732.

Witcher KG, Bray CE, Chunchai T, Zhao F, O'Neil SM, Gordillo AJ, Campbell WA, McKim DB, Liu X, Dziabis JE, Quan N, Eiferman DS, Fischer AJ, Kokiko-Cochran ON, Askwith C, Godbout JP (2021) *Traumatic Brain Injury Causes Chronic Cortical Inflammation and Neuronal Dysfunction Mediated by Microglia*. *J Neurosci* 41:1597-1616.

White JJ, Sillitoe RV (2013) *Development of the cerebellum: from gene expression patterns to circuit maps*. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:149-164.

Wolf SA, Boddeke HW, Kettenmann H (2017) *Microglia in Physiology and Disease*. *Annu Rev Physiol* 79:619-643.

Wu L, Kong L, Yang Y, Bian X, Wu S, Li B, Yin X, Mu L, Li J, Ye J (2019) *Effects of Cell Differentiation on the Phagocytic Activities of IgM+ B Cells in a Teleost Fish*. *Front Immunol* 10:2225.

Wu MD, Hein AM, Moravan MJ, Shaftel SS, Olschowka JA, O'Banion MK (2012) *Adult murine hippocampal neurogenesis is inhibited by sustained IL-1 β and not rescued by voluntary running*. *Brain Behav Immun* 26:292-300.

Wu XB, Zhu Q, Gao YJ (2021) *CCL2/CCR2 Contributes to the Altered Excitatory-inhibitory Synaptic Balance in the Nucleus Accumbens Shell Following Peripheral Nerve Injury-induced Neuropathic Pain*. *Neurosci Bull* 37:921-933.

X

Xavier AL, Menezes JR, Goldman SA, Nedergaard M (2014) *Fine-tuning the central nervous system: microglial modelling of cells and synapses*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:20130593.

Xu R, Boreland AJ, Li X, Erickson C, Jin M, Atkins C, Pang ZP, Daniels BP, Jiang P (2021) *Developing human pluripotent stem cell-based cerebral organoids with a controllable microglia ratio for modeling brain development and pathology*. Stem Cell Reports 16:1923-1937.

Y

Yang Q, Wang G, Zhang F (2020) *Role of Peripheral Immune Cells-Mediated Inflammation on the Process of Neurodegenerative Diseases*. Front Immunol 11:582825.

Yang X, Ren H, Wood K, Li M, Qiu S, Shi FD, Ma C, Liu Q (2018) *Depletion of microglia augments the dopaminergic neurotoxicity of MPTP*. FASEB J 32:3336-3345.

Yanguas-Casás N, Crespo-Castrillo A, Arevalo MA, Garcia-Segura LM (2020) *Aging and sex: Impact on microglia phagocytosis*. Aging Cell 19:e13182.

Yanguas-Casás N, Crespo-Castrillo A, de Ceballos ML, Chowen JA, Azcoitia I, Arevalo MA, Garcia-Segura LM (2018) *Sex differences in the phagocytic and migratory activity of microglia and their impairment by palmitic acid*. Glia 66:522-537.

Yao Y, Echeverry S, Shi XQ, Yang M, Yang QZ, Wang GY, Chambon J, Wu YC, Fu KY, De Koninck Y, Zhang J (2016) *Dynamics of spinal microglia repopulation following an acute depletion*. Sci Rep 6:22839.

Ye B, Liu B, Hao L, Zhu X, Yang L, Wang S, Xia P, Du Y, Meng S, Huang G, Qin X, Wang Y, Yan X, Li C, Hao J, Zhu P, He L, Tian Y, Fan Z (2018) *Klf4 glutamylation is required for cell reprogramming and early embryonic development in mice*. Nat Commun 9:1261.

Z

Zang X, Chen S, Zhu J, Ma J, Zhai Y (2022) *The Emerging Role of Central and Peripheral Immune Systems in Neurodegenerative Diseases*. Front Aging Neurosci 14:872134.

Zhang J (1997) *The nature of external representations in problem solving*. Cogn Sci 21:179-217.

Zhang J, Liu Y, Liu X, Li S, Cheng C, Chen S, Le W (2018) *Dynamic changes of CX3CL1/CX3CR1 axis during microglial activation and motor neuron loss in the spinal cord of ALS mouse model*. Transl Neurodegener 7:35.

Zhang JM, An J (2007) *Cytokines, inflammation, and pain*. Int Anesthesiol Clin 45:27-37.

Zhao J, Li Q, Ouyang X, Wang F, Li Q, Xu Z, Ji D, Wu Q, Zhang J, Lu C, Ji S, Li S (2023) *The effect of CX3CL1/CX3CR1 signal axis on microglia in central nervous system diseases*. J Neurorestoratology 11: 2324-2426.

Zhao X, Eyo UB, Murugan M, Wu LJ (2018) *Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology*. Dev Neurobiol 78:604-617.

Zhao X, Li J, Sun H (2019) *CD200-CD200R Interaction: An Important Regulator After Stroke*. Front Neurosci 13:840.

Zheng H, Liu CC, Atagi Y, Chen XF, Jia L, Yang L, He W, Zhang X, Kang SS, Rosenberry TL, Fryer JD, Zhang YW, Xu H, Bu G (2016) *Opposing roles of the triggering receptor expressed on myeloid cells 2 and triggering receptor expressed on myeloid cells-like transcript 2 in microglia activation*. Neurobiol Aging 42:132-141.

Zhu L, Skoultchi AI (2001) *Coordinating cell proliferation and differentiation*. Curr Opin Genet Dev 11:91-97.

Ziebell JM, Adelson PD, Lifshitz J (2015) *Microglia: dismantling and rebuilding circuits after acute neurological injury*. Metab Brain Dis 30:393-400.

Bibliografía

Zuiderwijk-Sick EA, van der Putten C, Timmerman R, Veth J, Pasini EM, van Straalen L, van der Valk P, Amor S, Bajramovic JJ (2021) *Exposure of Microglia to Interleukin-4 Represses NF- κ B-Dependent Transcription of Toll-Like Receptor-Induced Cytokines*. *Front Immunol* 12:771453.

ANEXO I:
Soluciones de laboratorio de uso común

F

FIJADOR SOMOGYI: el fijador se compone por paraformaldehído al 4% (p/v) y ácido pícrico saturado al 15% (v/v), tamponado con PB. Un litro de este medio se realiza mezclando 40 g de paraformaldehído con 300 ml de H₂O destilada a 90 °C. Para favorecer su despolimerización se añade 1 ml de NaOH 1 M. Se puede confirmar que se ha disuelto correctamente cuando la mezcla se vuelve transparente, que es en este momento cuando se enfria y se filtra. A esta solución se añaden 150 ml de la solución saturada de ácido pícrico filtrado y 500 ml de tampón fosfato 0,2 M, pH 7,4. Para finalizar, la solución se enrasa hasta 1 L con H₂O destilada.

M

MEDIO DE MONTAJE PARA FLUORESCENCIA “ANTIDESVANECIMIENTO”: compuesto por glicina 0,42% (p/v), NaOH 0,021% (p/v), NaCl 0,51% (p/v), N-propil galato 5% (p/v), glicerol 70% (v/v) y timerosal 0,002% (p/v). Para su preparación, se disuelven en 100 ml de glicerol al 70% (v/v) 0,42 g de glicina, 0,021 g de NaOH, 0,51 g de NaCl y 5 g de N-propil galato en 100 ml de glicerol al 70% (v/v). Al final del proceso se añade 1 ml de una predilución de timerosal al 2% (p/v). Para su conservación, el compuesto se almacena a 4 °C bajo oscuridad.

MEZCLA CONGELADORA: formada por glicerol al 30 % (v/v) y polietilenglicol al 30 % (v/v) tamponados con PB 0,1 M, pH 7,4. Para la preparación de 1 L se mezclan 200 ml de PB 0,5M, pH 7,4, 300 ml de glicerol, 300 ml de polietilenglicol y 200 ml de H₂O destilada. Para su conservación, la mezcla se almacena a 4 °C.

S

SOLUCIÓN CRIOPROTECTORA DE SACAROSA: constituida por sacarosa al 30% (p/v) en PB 0,1 M.

SOLUCIÓN DE LISIS PARA EXTRACCIÓN DE DNA: formada por SDS al 0,2% (p/v; Sigma-Aldrich), EDTA 5 mM (Sigma-Aldrich) NaCl 0,2 M (Sigma-Aldrich), tampón Tris-HCl 0,1 M (Fisher BioReagents) y proteinasa K 6 U/ml (Sigma-Aldrich).

SOLUCIÓN PARA GELATINIZAR PORTAS: para la preparación de esta solución, se disuelven 4,5 g de gelatina en polvo en 900 ml de H₂O destilada a 80 °C. Se añaden 0,44 g de sulfato de cromo III y potasio dodecahidratado. Los portaobjetos se introducen en la solución filtrada a 70 °C durante 5 min y se secan a 60 °C toda una noche. Se repite el proceso y cuando estén completamente secos se almacenan a T^a ambiente.

SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA: constituida por NaCl 0,9% (p/v) en H₂O destilada.

T

TAMPÓN DE LISIS PARA LA EXTRACCIÓN DE DNA: constituido por SDS al 0,2% (p/v), EDTA 5mM, NaCl 0,2 M, tampón Tris-HCl 0,1 M y proteinasa K 6 U/ml.

TAMPÓN FOSFATO (PB) 0,5 M, pH 7,4: compuesto por una mezcla de 0,5 M de Na₂HPO₄ dodecahidratado y NaH₂PO₄ dihidratado. Para su preparación, se disuelven 35,8 g de Na₂HPO₄ dodecahidratado en 100 ml de H₂O destilada y 7,8 g de NaH₂PO₄ dihidratado en 200 ml de H₂O destilada. Entonces, la segunda solución se añade sobre la primera hasta alcanzar el pH de 7,4.

TAMPÓN FOSFATO 0,2 M, pH 7,4: compuesto por una mezcla de 0,2 M de Na₂HPO₄ dodecahidratado y NaH₂PO₄ dihidratado. Para la preparación de 2 L se disuelven 107,4 g de Na₂HPO₄ dodecahidratado en 1,5 L de H₂O destilada y 15,6 g de NaH₂PO₄ dihidratado en 0,5 L de H₂O destilada. Entonces, la segunda solución se añade sobre la primera hasta alcanzar el pH de 7,4.

TAMPÓN FOSFATO 0,1 M, pH 7,4: para preparar 1 L de esta solución, se juntan 500 ml de PB 0,2 m con 500 ml de H₂O destilada.

TAMPÓN FOSFATO SALINO (PBS) PH 7,4: para la preparación de 1 L de esta solución se añaden 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 3,63 g de Na₂HPO₄ dodecahidratado y 0,21 de KH₂PO₄ en 1 L de H₂O destilada y se ajusta el pH a 7,4.

ANEXO II:
Soluciones para cultivos celulares

MEDIO CONDICIONADO DE ASTROCITOS (ACM): este medio se obtuvo a partir de cultivos de corteza de ratones neonatales WT. Estos animales se sacrificaron por decapitación y posteriormente se extrajeron sus cortezas cerebrales. El tejido extraído se depositó sobre una placa de Petri estéril con PBS. A continuación, se disgregó el tejido con una hoja de bisturí sobre una placa de Petri con 5 ml de una **solución A**, compuesta por 700 μ l de BSA, 500 μ l de DNasa y 50 ml de solución salina equilibrada de Earle (EBBS³³), y se pasó a un tubo Falcon de 50 ml para centrifugarlo a 37 °C, durante 2 min a 1.500 rpm. Después, las células se resuspendieron en 6 ml de la **solución B**, compuesta por 300 μ l de BSA, 500 μ l de DNasa, 500 μ l de Tripsina-EDTA y 20 ml de EBBS, dejando actuar la enzima durante 15 min a 37° C. Una vez pasado este tiempo, la reacción se paró con el doble de volumen de DMEM completo bajo en glucosa (10% FBS, 1% P/S). Después, se centrifugó de nuevo a 37° C, durante 5 min a 1.500 rpm, y se resuspendieron las células en 20 ml de la solución A para pasarlas a continuación por un tamiz celular estéril de 40 μ m. De nuevo, se centrifugó a 37° C, durante 5 min a 1.500 rpm. Finalmente, las células se resuspendieron en 10 ml de medio DMEM completo bajo en glucosa y se sembraron en un frasco de cultivo de 75 mm². Transcurridas 48 h se cambió el medio y se repitió el proceso durante aproximadamente 1 mes y medio, tiempo durante el que se recogió el medio extraído que constituiría nuestro medio condicionado WT.

MEDIO EAGLE MODIFICADO DE DULBECCO (DMEM) BAJO EN GLUCOSA: para la preparación de 500 ml de este medio, se disuelven 5 g de DMEM bajo en glucosa y 1,85 g de bicarbonato sódico en 500 ml de H₂O Milli-Q. Se ajusta el pH a 7,2 y, por último, el medio se introduce por un medio de filtrado (Corning). Una vez filtrado, se le añade tanto el FBS al 10% como la P/S al 1%.

SOLUCIÓN DE LISIS DE ERITROCITOS: esta solución se compone de 8,3 g de NH₄Cl (Sigma-Aldrich) y 1 g de KHCO₃ (Sigma-Aldrich) disueltos en 100 ml de H₂O destilada a los que se le añaden 200 μ l de EDTA 0,5 M, para después ajustar el pH a 7,4.

³³ Del inglés *Earle Balanced Salt Solution*.

POLI-L-LISINA: para su preparación, se resuspenden 5 mg de poli-L-Lisina en 50 ml de H₂O Milli-Q esterilizada.