

## Trabajo Fin de Grado

El papel de la oligodendroglía en las enfermedades neurodegenerativas (priónicas y prion-*like*)

*The role of oligodendroglia cells in neurodegenerative diseases (prion and prion-like)*

Autora

Marta Kurtz Cabello

Directores

Marta Monzón Garcés

Facultad de Medicina  
Año 2020/2021

A mis padres Pilar y Alfonso, a mis abuelos  
y a mis hermanos Carolina, Alfonso, Matilde, Gustavo y Nieves.

## AGRADECIMIENTOS

---

Me gustaría dedicar unas palabras a algunas de las personas que han hecho posible que llegara hasta aquí.

En primer lugar a mi tutora Marta, que con su ejemplo, su profesionalidad, y su implicación en todo momento, ha sido más que una gran ayuda y me ha enseñado este pequeño mundo que es la investigación.

En segundo lugar, a todo el personal tanto técnicos de laboratorio, como veterinarios o becarios del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza por su ayuda y compañerismo mientras realicé la parte experimental de este trabajo.

A mis amigos y amigas que son pilar fundamental y una de las razones por las que estos años universitarios han sido absolutamente increíbles.

Y por último, y no menos importante, a mi madre, la que más me aguanta en mis días buenos y no tan buenos y en general, a toda mi familia por apoyarme no sólo durante este último periodo sino también durante estos 6 largos años de esta carrera tan dura pero tan bonita.

# ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 ENFERMEDADES PRIÓNICAS</b> .....	<b>5</b>
1.1.1 Historia.....	5
1.1.2 Epidemiología.....	7
1.1.3 Etiología.....	7
1.1.3.1 Genética .....	7
1.1.3.2 Agente etiológico.....	8
1.1.4 Diagnóstico de las enfermedades priónicas.....	8
1.1.5 Tratamiento de las enfermedades priónicas.....	9
<b>1.2 ENFERMEDADES PRION-LIKE</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3 LAS CÉLULAS GLIALES</b> .....	<b>10</b>
1.3.1 Astrogliá.....	11
1.3.2 Microgliá.....	13
1.3.3 Oligodendroglía .....	14
1.3.3.1 Origen embrionario y papel de los genes Olig1 y Olig2. ....	14
1.3.3.2 Los oligodendrocitos como apoyo metabólico neuronal .....	16
1.3.3.3 El papel de la oligodendroglía en las enfermedades neurodegenerativas.....	17
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Controles de la técnica</b> .....	<b>22</b>
<b>4.2 Controles de la enfermedad (animales sanos)</b> .....	<b>23</b>
<b>4.3 Animales afectados de Scrapie. Estadio PRECLÍNICO</b> .....	<b>23</b>
<b>4.4 Animales afectados de Scrapie. Estadio CLÍNICO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.5 Animales enfermos con Scrapie. Estadio TERMINAL</b> .....	<b>24</b>
<b>5. DISCUSIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>33</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>34</b>

## RESUMEN

---

***Introducción y objetivos:*** Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles son un grupo de enfermedades neurodegenerativas con un desenlace fatal. Su signo patognomónico es la acumulación de una proteína mal plegada o aberrante llamada prión (PrP<sup>Sc</sup>), característica común en otras patologías neurodegenerativas, que se denominarán por ello “prion-like”. Actualmente, la visión neurocentrista de estas enfermedades ha sido sustituida por la de un papel relevante de la neuroglía como elemento fundamental en su patogenia. En este trabajo nos centramos en esta población glial, concretamente en la oligodendroglía, para estudiar qué papel desempeña en el progreso neurodegenerativo utilizando el Scrapie como prototipo de la enfermedad priónica. Para ello se valorarán, tanto alteraciones cuantitativas como morfológicas en función del estadio clínico. Se pretende así, evaluar la implicación de esta población celular en la evolución del proceso neurodegenerativo con el fin de extrapolar las conclusiones al resto de enfermedades priónicas y prion-like.

***Material y métodos:*** Se han incluido 31 muestras de cerebelo de especie ovina, siendo 8 de ellas animales sanos (control) y 23 animales afectados de Scrapie en diferentes estadios clínicos (preclínico, clínico y terminal). El anticuerpo primario utilizado como marcador específico frente a oligodendroglía ha sido Olig2.

***Resultados:*** Se han observado dos morfologías claramente diferentes; una de ellas, estrellada y ramificada, descrita por primera vez en la bibliografía. También se ha demostrado una evidente disminución en la intensidad del inmunomarcaje ya desde el inicio de la enfermedad, que aumentaba conforme progresaba la enfermedad.

***Conclusiones:*** Aunque serán necesarios estudios adicionales para confirmarlo, la disminución de la inmunotinción frente a Olig2 evidenciada en este trabajo sugiere una lesión oligodendrocitaria en el proceso evolutivo de la neurodegeneración, en este caso de las enfermedades priónicas. El cambio morfológico identificado podría reflejar una transición progresiva hacia oligodendrocitos a partir de células progenitoras NG2-glía como respuesta neurogénica tras un daño celular producido por la enfermedad, apoyando la teoría compensatoria por parte de la neuroglía, en este caso de la oligodendroglía, ante un daño o estímulo patológico del sistema nervioso central.

## PALABRAS CLAVE

---

Enfermedades neurodegenerativas, enfermedades priónicas, prion-like, prión, Scrapie, neuroglía, oligodendroglía, Olig2.

## ***ABSTRACT***

---

***Introduction and objectives:*** Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies are a group of neurodegenerative diseases with a fatal outcome. Their pathognomonic sign is the accumulation of an aberrant protein called prion (PrP<sup>Sc</sup>), a common characteristic shared by other neurodegenerative diseases, which will therefore be called 'prion-like'. Currently, the neurocentral view of these diseases has been replaced by that based on a relevant role of neuroglia as a fundamental element in their pathogenesis. In this work we focus on this glial population, specifically on oligodendroglia, to study its role in neurodegenerative progression using Scrapie as a prototype of prion disease. For this purpose, both quantitative and morphological alterations will be assessed according to the clinical stage. The aim is to evaluate the implication of these cells in the evolution of the neurodegenerative process in order to extrapolate the conclusions to the rest of prion and prion-like diseases.

***Methods:*** A total of 31 sheep cerebellum samples were included, 8 of which were healthy animals (control) and 23 animals affected by Scrapie at different clinical stages (preclinical, clinical and terminal). The primary antibody used as a specific marker for oligodendroglia was Olig2.

***Results:*** Two distinctly different morphologies have been observed; one of them, stellate and branched, described for the first time in the literature. An evident decrease in the intensity of immunostaining has also been demonstrated as early as the onset of the disease, and increasing as the disease progressed.

***Conclusions:*** Although further studies will be necessary to confirm it, the decrease in immunostaining for Olig2 evidenced in this work suggests an oligodendrocyte injury in the evolutionary process of neurodegeneration, in this case of prion diseases. The morphological change identified could reflect a progressive transition to oligodendrocytes from NG2-glia progenitor cells as a neurogenic response after cell damage produced by the disease, supporting the compensatory theory on the part of neuroglia, in this case oligodendroglia, due to a damage or pathological stimulus of the central nervous system.

## ***KEY WORDS***

---

*Neurodegenerative diseases, prion diseases, prion-like, prion, Scrapie, glial cells, oligodendroglia, Olig2.*

## LISTADO DE ABREVIATURAS

---

<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>IEF:</b> Insomnio esporádico fatal
<b>ATP:</b> Adenosín trifosfato	<b>IFF:</b> Insomnio familiar fatal
<b>BHE:</b> Barrera hematoencefálica	<b>ISCHII:</b> Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III
<b>CNPasa:</b> 2'3-nucleótido cíclico 3'fosfodiesterasa	<b>MBP:</b> Proteína básica de la mielina
<b>CPD:</b> Encefalopatía espongiiforme en dromedarios o enfermedad priónica de camélidos	<b>MCT:</b> Transportadores de monocarboxilato
<b>DAB+:</b> Diaminobencidina	<b>MHCII:</b> Complejo mayor de histocompatibilidad tipo II
<b>DFT:</b> Demencia frontotemporal	<b>Myrf:</b> Factor regulador de mielina
<b>EA:</b> Enfermedad de Alzheimer	<b>NHP:</b> Encefalopatía transmisible en primates no humanos
<b>EEB:</b> Encefalopatía espongiiforme bovina	<b>OPC o NG2-glia:</b> Células progenitoras oligodendrocitarias
<b>EEC:</b> Enfermedad caquetizante del ciervo	<b>PLP:</b> Proteína proteolípida
<b>eECJ:</b> Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádico	<b>PrP-AAC:</b> Angiopatía cerebral amiloide causada por priones
<b>EEF:</b> Encefalopatía espongiiforme felina	<b>PrP<sup>c</sup>:</b> Proteína prión celular
<b>EEG:</b> Electroencefalograma	<b>PrP<sup>Sc</sup>:</b> Proteína prión patológica
<b>EET:</b> Encefalopatías espongiiformes transmisibles	<b>PVSPr:</b> Proteinopatía variablemente sensible a la proteasa
<b>EH:</b> Enfermedad de Huntington	<b>RMN:</b> Resonancia magnética nuclear
<b>ELA:</b> Esclerosis lateral amiotrófica	<b>SNC:</b> Sistema nervioso central
<b>EP:</b> Enfermedad de Parkinson	<b>SNP:</b> Sistema nervioso periférico
<b>EUE:</b> Encefalopatía de animales exóticos	<b>SOD1:</b> Superóxido dismutasa
<b>gECJ:</b> Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genético	<b>TDP43:</b> Proteína de unión ADN TAR 43
<b>GF:</b> Glucolípido fosfatidilinositol	<b>vECJ:</b> Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
<b>GFAP:</b> Proteína ácida fibrilar glial	
<b>GSS:</b> Síndrome de Germmann-Straussler-Scheinker	
<b>iECJ:</b> Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénico	

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Las enfermedades neurodegenerativas constituyen un grupo heterogéneo de enfermedades que afectan al sistema nervioso central (SNC) caracterizándose por una pérdida crónica y progresiva tanto de la morfología como de la función neuronal (1). En este trabajo nos centramos en un grupo de enfermedades neurodegenerativas poco frecuentes, asociadas a una errónea conformación de proteínas, las enfermedades priónicas. Estas enfermedades, también llamadas prionopatías o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) centran su patogenia en la acumulación de una proteína malplegada o aberrante, que da lugar a procesos neurodegenerativos tanto en la especie humana como en diferentes especies animales. Estas enfermedades pueden ser clasificadas en adquiridas (debido a la infección por el agente causal), hereditarias o genéticas (asociada a mutaciones en el gen que codifica la proteína prión) y esporádicas o idiopáticas (en los casos en los que se han descartado las otras dos posibles etiologías). Cuando se acumula esta proteína en el SNC es cuando aparecen las lesiones con características espongiformes que dan lugar a la enfermedad, siempre con un desenlace fatal.

### 1.1.1 Historia

En la literatura se describe que en 1732, ganaderos europeos observaron en su ganado ovino y caprino una enfermedad con un periodo de incubación largo (desde meses hasta incluso años), una evolución lenta y un desenlace fatal a lo que se denominó más adelante “Scrapie”. Actualmente, constituye el prototipo de enfermedad priónica, usándose como modelo para el estudio de estas enfermedades (2). Se desconocía el posible origen de esta enfermedad ya que a pesar de eliminar rebaños enteros, la enfermedad volvía a aparecer, lo que ha llevado a numerosos estudios sobre esta patología además de en animales, en el ambiente. Fue en 1982 cuando Prusiner estableció la teoría del prión, todavía la más aceptada, que postula como el agente causal de este grupo de enfermedades una proteína sin material genético y con capacidad autorreplicativa denominada “prión” (*Proteinaceous infectious particle*) (3).

Actualmente se conocen las siguientes EET descritas en animales. La encefalopatía espongiforme bovina (EEB, *enfermedad de las vacas locas*), cuya



relevancia aumentó al demostrarse una relación con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en humanos; la enfermedad caquetizante del ciervo (EEC), la encefalopatía de animales exóticos (EUE), la encefalopatía espongiiforme felina (EEF), la encefalopatía transmisible en primates no humanos (NHP), y recientemente descrita, la encefalopatía espongiiforme en dromedarios o enfermedad priónica de camélidos (CPD) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Encefalopatías espongiiformes transmisibles en animales (4)(5).

<i>Enfermedad</i>	<i>Especies afectadas</i>	<i>Etiología</i>	<i>Año de descripción</i>
<b>Scrapie</b>	Oveja, cabra	Adquirida	1732
<b>ECC</b>	Ciervo, reno, alce	Adquirida	1967
<b>EEB</b>	Vaca	Adquirida	1986
<b>EUE</b>	Nyala, Antilope, bisonte	Adquirida	1986
<b>EEF</b>	Gato, felinos salvajes	Adquirida	1990
<b>NHP</b>	Lemur y macaco	Adquirida	1996
<b>CPD</b>	Dromedario	Desconocida (probablemente adquirida)	2018

*EEC* (Enfermedad caquetizante del ciervo); *EEB* (Encefalopatía espongiiforme bovina clásica); *EUE* (encefalopatía de animales exóticos); *EEF* (Encefalopatía espongiiforme felina); *NHP* (Encefalopatía espongiiforme transmisible en primates no humanos); *CPD* (Encefalopatía priónica del camello).

Fue a principios del siglo XX cuando en Alemania se describió la primera enfermedad priónica humana conocida, dando su nombre a sus autores, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (6)(7). Posteriormente, se describieron otras enfermedades como el síndrome de Germann-Straussler-Scheinker (GSS) en una familia austriaca, el kuru, descrito en Papua-Nueva Guinea, que posteriormente fue relacionada con rituales de canibalismo practicados en las tribus afectadas, demostrando así el carácter transmisible de la enfermedad. A este grupo de enfermedades también pertenecen el insomnio familiar fatal (IFF) y el insomnio esporádico fatal (IEF). Otras enfermedades conocidas en humanos son la angiopatía cerebral amiloide causada por priones (PrP-AAC) y la más recientemente descrita, la proteinopatía variablemente sensible a la proteasa (PVSP) (8) (Tabla 2).

**Tabla 2. Enfermedades priónicas humanas (9)**

<b>Enfermedad</b>	<b>Etiología mas probable</b>
<b>Kuru</b>	Adquirida
<b>Variante de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)</b>	Adquirida
<b>Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (iECJ)</b>	Adquirida
<b>Creutzfeldt-Jakob genético (gECJ)</b>	Genética
<b>Creutzfeldt-Jakob esporádico (eECJ)</b>	Idiopática
<b>Síndrome de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS)</b>	Genética
<b>Insomnio Familiar Fatal (IFF)</b>	Genética
<b>Insomnio esporádico Fatal (IEF)</b>	Idiopática
<b>Angiopatia cerebral amiloide causada por priones (PrP-CAA)</b>	Genética
<b>Prionopatía variablemente sensible a la proteasa (PVSP)</b>	Idiopática

### **1.1.2 Epidemiología**

Las EET humanas son enfermedades raras con una incidencia anual aproximadamente de entre 1 y 2 casos por millón de habitantes (10). La mayoría de los casos es de tipo esporádico o idiopático (85%; eECJ) y un 10-15% lo constituyen las formas familiares. Tienen una incidencia mayor en adultos mayores de 60 años, por lo que a veces es de difícil diagnóstico en pacientes que fallecen por demencia, ya que no se piensa en esta patología por su baja incidencia (9).

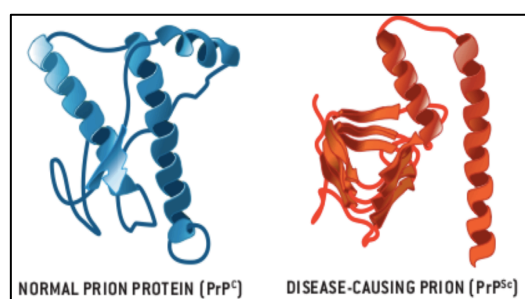
### **1.1.3 Etiología**

#### **1.1.3.1 Genética**

La proteína prión celular, PrP<sup>c</sup> está codificada por el gen PRPN humano que se expresa de forma constitutiva en diversos tejidos de animales adultos y se encuentra en un control riguroso durante el desarrollo embrionario. Los niveles más altos de ARN mensajero y de proteína se localizan en el tejido neuronal especialmente en el hipocampo, mientras existen niveles sensiblemente más bajos en otros tejidos y órganos como el corazón, músculo esquelético, hígado o glándula mamaria. Los genes de la proteína PrP de humanos y ratones se localizan en cromosomas 20 y 2 respectivamente (11). Independientemente de la etiología de la enfermedad priónica, existe una relación genética debido a diferentes polimorfismos del gen PRPN, que tienen influencia a varios niveles, tanto a nivel del fenotipo clínico, como la predisposición o la duración de la enfermedad (12).

### 1.1.3.2 Agente etiológico

La proteína prión patológica, PrP<sup>Sc</sup> es una isoforma anormal de la PrP<sup>c</sup>. Esta proteína se encuentra situada en la región extracelular de la membrana unido por un glucolípidio fosfatidilinositol (GF) de anclaje. Se considera ubicua en todas las células del organismo de mamíferos, siendo abundante en células del SNC, tanto en las neuronas como en la neuroglía (13). Desde el punto de vista bioquímico, el origen de las enfermedades priónicas se basa en un cambio conformacional de la estructura terciaria de la PrP<sup>c</sup>, rica en  $\alpha$ -hélice, que se transforma en una isoforma aberrante rica en  $\beta$ -lámina plegada, PrP<sup>Sc</sup>, disminuyendo así la solubilidad y aumentando su resistencia a las proteasas (Figura 1). Existen varios co-factores que parecen intervenir en este proceso. Además, se piensa que esta conversión se produce en la superficie celular o a través de vías endocíticas (14). Sin embargo, no está claro si hay una pérdida de funcionalidad fisiológica o mayor capacidad neurotóxica, ya que hay pocas evidencias de que la PrP<sup>Sc</sup> sea tóxica por sí misma. Lo que se ha demostrado es que la presencia de PrP<sup>c</sup> es necesaria para el desarrollo de la enfermedad sufriendo una autorreplicación y conversión a PrP<sup>Sc</sup>. Ambos mecanismos no se conocen exactamente y por ello hay diversas hipótesis o modelos descritos (3).



**Figura 1.** Estructura molecular 3D de la proteína prión celular y patológica. Contenido en  $\alpha$ -hélice y  $\beta$ -plegada 40% - 3% y 30% - 40% respectivamente (15).

### 1.1.4 Diagnóstico de las enfermedades priónicas

El programa de vigilancia y diagnóstico de las enfermedades priónicas humanas en España se lleva a cabo a través del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de acuerdo con las recomendaciones europeas de vigilancia. Por ello, existe un registro a nivel nacional, con el objetivo de establecer un perfil clínico-epidemiológico, identificar nuevos casos de ECJ e identificar factores de riesgo (16).

El diagnóstico de las EET o prionopatías principalmente se basa en una sospecha clínica; sin embargo, resulta difícil ya que el cuadro clínico puede confundirse con numerosas enfermedades neurológicas, como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson o la encefalitis, por lo que se incluyen en el diagnóstico diferencial. La presencia de demencia rápidamente progresiva, desde meses hasta uno o dos años, acompañados de numerosos síntomas neurológicos como mioclonías, signos piramidales y/o extrapiramidales, afectación visual o cerebelosa, debe hacer sospechar de una EET. No obstante, son una serie de pruebas complementarias que se comentan a continuación las que establecen un diagnóstico más fiable o “probable”. Para el diagnóstico definitivo es necesario el estudio anatomopatológico del SNC extraído por autopsia. Existe la posibilidad de realizar una biopsia cerebral *ante mortem*, pero se trata de un procedimiento invasivo con alto riesgo para el paciente y por lo tanto solo se reserva para casos en el que haya que descartar otra patología que tuviera tratamiento curativo (17).

Así, un caso de enfermedad priónica posible, probable o definitiva se determina en función de unos criterios diagnósticos establecidos en las recomendaciones europeas para la vigilancia de EET humanas, asociando la sospecha clínica anteriormente comentada, la epidemiología y pruebas complementarias como el estudio genético, el estudio del líquido cefalorraquídeo para determinar la presencia de proteína 14.3.3, el electroencefalograma (EEG) o la resonancia magnética nuclear (RMN) (9), teniendo en cuenta que las enfermedades neurodegenerativas son raras y poco frecuentes y muchas veces suelen aparecer casos atípicos.

### **1.1.5 Tratamiento de las enfermedades priónicas**

Las prionopatías son un grupo de enfermedades neurodegenerativas mortales y actualmente no existe ningún tratamiento específico que pueda revertir o detener la neurodegeneración, por lo que el tratamiento es sintomático. Es por ello, que a pesar de identificarse diversos fármacos que muestran cierta eficacia en el tratamiento de estas enfermedades en sistemas de cultivo o ensayos en animales (como por ejemplo quinacrina o polisulfato de pentosán) en humanos siguen si verse un beneficio terapéutico significativo (18) por lo que uno de los objetivos principales en este grupo de enfermedades actualmente es la investigación para un futuro terapéutico.

## **1.2 ENFERMEDADES PRION-LIKE**

Las enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Huntington (EH), la enfermedad de Parkinson (EP), la Esclerosis lateral amiotrófica (ELA) o la demencia frontotemporal (DFT) se caracterizan por la acumulación progresiva de proteínas amiloidogénicas anormales en el SNC. Numerosos estudios experimentales determinan que la formación de esta acumulación se origina de forma similar a la descrita en la proteína prión, por lo que se produce una proliferación y acumulación intra y extra celular de proteínas malplegadas o aberrantes, constituyendo alteraciones específicas en cada una de las enfermedades. Los depósitos, así como el fenotipo de la patología asociada a cada una de ellas, están controlados por el propio agente y el huésped de manera similar a las enfermedades priónicas. En estos casos, el huésped en el que se produce el acúmulo proporciona el entorno bioquímico y fisiológico que favorece o restringe su aparición, su proliferación y su propagación por lo que supone un papel fundamental a la hora de presentar estas patologías.

Se han descrito proteínas específicas asociadas a diversas enfermedades neurodegenerativas que comparten su mecanismo patogénico con las enfermedades priónicas como: A $\beta$  (relacionado con la EA y PrP-AAC), la proteína tau (en taupatías, EA y otras),  $\alpha$ -sinucleína (EP, enfermedad de cuerpos de Lewis, y atrofia multisistémica), huntingtina (EH) y varias proteínas asociadas como la superóxido dismutasa (SOD1) o la proteína de unión ADN TAR43 (TDP43) dentro de los síndromes DFT y ELA (19).

Desde el punto de vista neuropatológico, todas estas enfermedades neurodegenerativas comparten alteraciones características con las enfermedades priónicas, denominándose “*prion-like*”, como la muerte neuronal, la acumulación de proteínas mal-plegadas intra y extracelular con formación de placas amiloides o gliosis; incluso la espongirosis en ciertos casos descritos de EA, demencia de cuerpos de lewy o ELA (20)(21).

## **1.3 LAS CÉLULAS GLIALES**

Las células gliales, conocidas como neuroglia, han sido denominadas clásicamente como una sustancia o tejido conectivo donde se observaban corpúsculos, núcleos y un número variable de células. Posteriormente Golgi, con la tinción argéntica

identificó varios tipos de células gliales que describió como células redondeadas con prolongaciones que conectaban vasos sanguíneos. Años después, Weigert describió un tipo de glía fibrosa localizada en la sustancia blanca diferenciándola así de la glía de la sustancia gris. Fue más tarde cuando Pio del Rio Hortega, alumno de Ramón y Cajal descubrió un grupo células diferentes de las neuronas y la astrología, que correspondería a la microglía y la oligodendroglía. Actualmente las células de la glía se clasifican en dos grupos principales, la neuroglía periférica (células de Schwann, células satélite, entre otras) y la neuroglía del SNC (astrocitos, oligodendrocitos, microglía y células ependimales). Existen otras clasificaciones más exhaustivas que dividen subtipos dentro de cada grupo celular (22).

No hay consenso sobre el número de células neurogliales exactas ni proporción de neuroglía por cada neurona. Anteriormente se creía que el cerebro humano contenía 100.000 millones de neuronas y casi un billón de células gliales con una proporción neurona : glía de 10:1. Este recuento ha sido cuestionado y recientemente se ha validado que la neuroglía suponen aproximadamente el 50% del volumen del cerebro humano con una proporción glía : neurona inferior a 1:1 y un número total de <100.000 millones de células gliales, ocupando los espacios que dejan las neuronas y sus prolongaciones (23). Se pensaba que estas células no intervienen en la generación y propagación del impulso nervioso. Sin embargo, como se desarrolla a continuación, se ha demostrado que realizan un papel fundamental en la regulación del funcionamiento neuronal.

En general las enfermedades, incluyendo las neurodegenerativas, se definen de una forma muy amplia como fallos homeostáticos en un tejido, órgano o sistema. Durante muchos años en el ámbito de las patologías neurodegenerativas ha predominado una visión neurocentrista donde la patología del SNC se centraba en la muerte o supervivencia neuronal. Actualmente esa visión está siendo sustituida por el relevante papel de la neuroglía, considerada un elemento central en la patología de estas enfermedades (24).

### **1.3.1 Astroglía**

Al igual que los oligodendrocitos, los astrocitos son de origen ectodérmico. Presentan una morfología estrellada y se encuentran tapizando la superficie neuronal, tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca. Anteriormente se proponía una clasificación de la astroglía como astrocitos protoplasmáticos aquellos localizados en la

sustancia gris y como astrocitos fibrosos los que se localizaban en la sustancia blanca. Sin embargo, actualmente se pueden identificar varias subpoblaciones con morfología y funciones muy diferentes (22). Diferenciando así: protoplasmáticos, fibrosos, velados (variante morfológica de los astrocitos protoplasmáticos), asociados a superficie, marginales y glía radial (células bipolares que se extienden por el interior del tubo neural y una vez han madurado se denominan astrogliá radial) (25) (22).

Se ha visto que los astrocitos son una familia muy heterogénea, tanto en la morfología como en sus funciones demostrando una alta plasticidad y llevando a cabo el mantenimiento de las funciones del SNC desde el desarrollo hasta la vejez (22). Funciones como: Soporte físico, definiendo la citoarquitectura de la sustancia gris, cubren las capas del SNC incluyendo las capas más externas. Participan en la fagocitosis de la sinapsis durante el proceso de remodelación neuronal del SNC, lo que anteriormente sólo se atribuía a las células microgliales (26). También participan en la sinaptogénesis, formando parte de las redes neuronales. Establecen uniones con los vasos sanguíneos a través de los pies vasculares cubriendo todo el sistema vascular del SNC y liberando sustancias vasoactivas que controlan la hiperemia funcional, constituyendo así una pieza fundamental en el mantenimiento de la barrera hematoencefálica (BHE).

Participan en procesos de reparación dentro del SNC por un proceso llamado astrogliosis o gliosis reactiva. Hace referencia a la respuesta de los astrocitos que sufren un cambio estructural/funcional frente a cualquier estímulo del SNC como proceso beneficioso para reparar el tejido dañado (27). El estímulo provocado en el SNC induce a una hipertrofia y/o hiperplasia en los astrocitos reflejando un cambio funcional y morfológico en ellos. Estos rellenan el espacio ocupado por el tejido lesionado dejando como resultado una cicatriz glial. A pesar de iniciarse como un proceso beneficioso, puede tener efectos perjudiciales de manera comparable al proceso de inflamación. De hecho, la activación de la astrogliá en cerebelo ha mostrado unos patrones específicos de alteraciones que han sugerido un papel importante tanto en el proceso de neurodegeneración, como en el de neuroprotección en determinadas enfermedades neurodegenerativas (28).

### **1.3.2 Microglía**

A diferencia del resto de células neurogliales, las células de la microglía tienen un origen mesodérmico. El comportamiento de la microglía con algunas de las células que intervienen en procesos inmunitarios e inflamatorios de tejidos periféricos así como la utilización de macromoléculas como citocinas, quimiocinas y sus receptores, ha convertido a esta población celular en un potencial origen de estudio en enfermedades neurodegenerativas (29).

Las células de la microglía son las células fagocíticas o macrófagos propias del encéfalo, la médula espinal, la retina o el bulbo olfatorio donde la infiltración de monocitos y linfocitos periféricos es limitada. Entre las funciones de la microglía destacan: La fagocitosis, con la que eliminan células dañadas o apoptóticas, restos celulares, células tumorales incluso diversos organismos como virus. Es una función defensiva relacionada con la mayoría del resto de funciones. Están implicadas en el desarrollo embrionario del SNC, con la neurogénesis y remodelación nerviosa en la edad adulta, en el mantenimiento y regulación de la BHE, el soporte estructural y organización del SNC y su homeostasis. Se trata de la estirpe principal de la respuesta inmunitaria en el SNC frente a agentes externos con capacidad citotóxica y capaz de actuar como célula presentadora de antígeno. Además constituye uno de los grupos celulares capaces de producir y liberar citosinas, quimiocinas e incluso productos antimicrobianos (30).

Este tipo de glía son células capaces de cambiar y modificar su morfología alterando su funcionalidad al modificar su estado de activación, pasando a estar en un estado reactivo frente al daño tisular, además de ser capaz de migrar a través de todo el SNC. Algunos estudios defienden que este comportamiento de la microglía reactiva constituye una respuesta neuroprotectora a través de la liberación de neurotrofinas, aunque otros defienden que un exceso de sobreactivación o una activación crónica provocarían una respuesta citotóxica o neurotóxica, provocada por la fagocitosis neuronal, liberación de moléculas reactivas o factores de necrosis tumoral. Estas hipótesis colocan a la microglía como punto de mira para el estudio en las enfermedades neurodegenerativas (31).



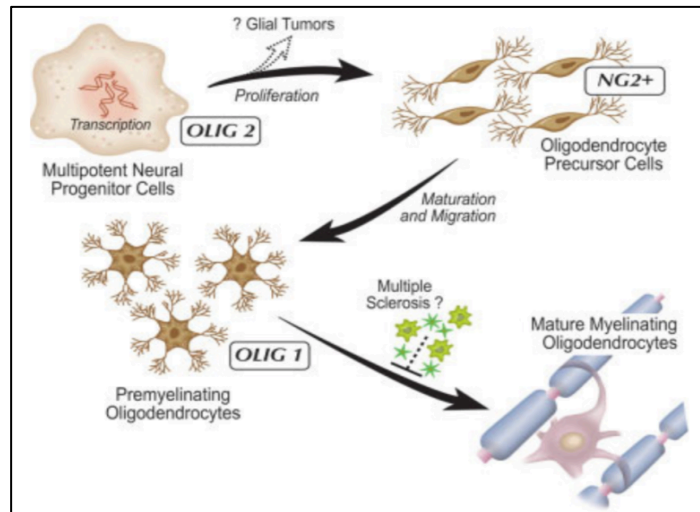
### **1.3.3 Oligodendroglía**

Los oligodendrocitos son células de origen ectodérmico que derivan de las células progenitoras oligodendrocitarias (OPC, también llamadas NG2-glía) cuya principal función es la producción de mielina, una estructura lipídica multilaminar que envuelve los axones y la principal responsable de que se produzca una conducción eficiente de los impulsos nerviosos en el axón (potenciales de acción). En 1919, Río-Hortega (32) describió por primera vez los oligodendrocitos y la microglía como tipos celulares separados que, junto a los astrocitos y las células endoteliales, formaban la neuroglía. Durante mucho tiempo se pensó que las células de la glía solo desempeñaban un papel pasivo en el cerebro, es decir, apoyar y formar parte del entorno de las neuronas. Sin embargo, en las últimas décadas se han centrado en las funciones individuales de estas células no neuronales en relación a la homeostasis cerebral. Cada oligodendrocito puede abarcar hasta 50 segmentos internodales de mielina sobre diversos axones, a diferencia de las células de Schwann que cada una de ellas rodea un solo axón y son capaces de renovar sus vainas de mielina hasta tres veces en 24 horas (33). Una vez completada la mielinización, los oligodendrocitos nacidos en la edad adulta siguen contribuyendo a la remodelación de las vainas de mielina.

#### **1.3.3.1 Origen embrionario y papel de los genes Olig1 y Olig2.**

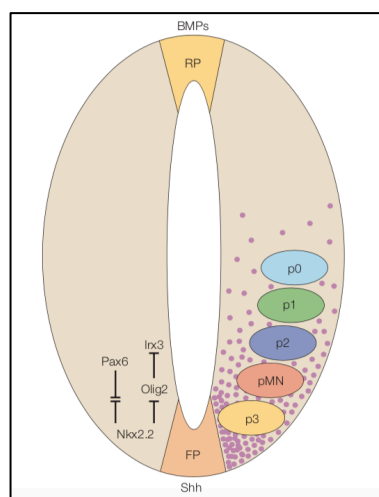
A pesar de que los animales invertebrados tienen glía envolvente que produce componentes de mielina, se ha demostrado que los oligodendrocitos productores de mielina y las células precursoras de oligodendrocitos (OPC) son exclusivos de animales vertebrados. En los últimos años se ha producido avances significativos en este campo.

La identificación de Olig1 y Olig2, que codifican factores de transcripción reguladores de etapas clave del desarrollo temprano de los oligodendrocitos, ha proporcionado una visión crítica sobre el origen de los OPC, así como su relación con otras células del SNC. En concreto, parece que Olig 1 desempeña un papel importante durante la maduración de los oligodendrocitos (importante en la EM), mientras que Olig2 parece ser necesario para la diferenciación de oligodendrocitos (desarrollo de células progenitoras NG2) y motoneuronas (Figura 2) (34). Es por ello que Olig 2, al ser un marcador que expresan tanto oligodendrocitos en proceso de maduración como en los maduros y mielinizantes, ha sido utilizado más comúnmente en la bibliografía para marcar las células de la oligodendroglía.



**Figura 2.** Esquema de las funciones de los genes *Olig 1* y *Olig 2* en el desarrollo y maduración de los oligodendrocitos y relación con enfermedades del SNC (34).

Dentro del tubo neural existen dominios únicos para los progenitores neuronales. Los progenitores de las motoneuronas y las interneuronas se forman en distintos dominios del tubo neural ventral restringidos por regiones. Los dominios p0-p3 (Figura 3) dan lugar a varios subtipos de interneuronas, mientras que en el dominio pMN, a través de la señalización *Shh*, activa *Olig2*, necesario para la producción tanto de motoneuronas como de OPC (35). A pesar de que ahora se sabe bastante sobre los genes *Olig* en las etapas tempranas del desarrollo del SNC, estos genes siguen expresándose en oligodendrocitos maduros y probablemente en células progenitoras pluripotenciales del cerebro adulto siendo motivo de numerosos estudios futuros.



**Figura 3.** Dominios del tubo neural para los progenitores neuronales. Los puntos rosas indican el gradiente de señalización *Shh* (regulador de la expresión inicial de los factores de transcripción en el tubo neural ventral) (35).

### 1.3.3.2 Los oligodendrocitos como apoyo metabólico neuronal

Las neuronas son células capaces de recibir miles de aferencias sinápticas con información que transmiten a través de los axones en forma de potencial de acción. Se necesita energía constante para el transporte, así como para mantener el gradiente  $\text{Na}^+ / \text{K}^+$  necesario para esos potenciales de acción, ya que las neuronas no tienen reservas de energía significativas (en comparación con los astrocitos, que almacenan glucosa en forma de glucógeno). Esta energía en forma de ATP (adenosín trifosfato), se genera a partir de transportadores de glucosa de los cuerpos neuronales, pero además se cree que es necesaria energía local para mantener la función axonal durante todo su recorrido. Este acceso de glucosa queda restringido mayoritariamente por la presencia de la mielina, ya que se trata de una barrera hidrofóbica, formada por la oligodendroglía en el SNC y por las células de Schwann en el sistema nervioso periférico (SNP). Dado que la mayor parte de la superficie del axón está cubierta de mielina, sólo un pequeño porcentaje del axón está expuesto al espacio extracelular (nodos de Ranvier), lo que limita el acceso a la glucosa y a otros metabolitos energéticos. Por esta razón, se ha postulado que los axones obtienen parte de la energía metabólica directamente de la oligodendroglía a través de las vainas de mielina (36)(37).

Muchas vías intrínsecas y extrínsecas a la célula contribuyen a la mielinización por parte de los oligodendrocitos y recientemente se ha puesto en estudio un enfoque a partir de cambios en el ensamblaje de una proteína, la actina. Una de las principales proteínas expresadas en la mielina, la proteína básica de la mielina (MBP), impulsa la despolimerización de los filamentos de la actina y la compactación de la mielina, mientras que otra proteína de los oligodendrocitos, la 2'3' nucleótido cíclico 3' fosfodiesterasa (CNPasa) contrarresta la compactación de la mielina promoviendo el ensamblaje en filamentos de la actina, presentando así una relación antagónica (38).

Este ensamblaje de la actina permite que se desarrollen canales mielínicos no compactados dentro de las capas de mielina, lo que favorece el tránsito de pequeñas moléculas y metabolitos entre el citoplasma del oligodendrocito. Esta disposición de mielina no es estática sino mucho más dinámica de lo que se pensaba inicialmente, ya que presenta cambios adaptativos impulsados por cambios en la actividad neuronal (plasticidad de la mielina). Se ha visto que el bloqueo de la oligodendrogénesis mediante la supresión del factor de transcripción oligodendrocitario Myrf (regulador de

oligodendrocitos factor regulador de la mielina) inhibe la mielinización *de novo* y como consecuencia, el aprendizaje de una nueva tarea motora, lo que sugiere que la síntesis y deposición de nueva mielina a los largo de las neuronas es fundamental para el aprendizaje de habilidades motoras complejas (37).

### **1.3.3.3 El papel de la oligodendroglía en las enfermedades neurodegenerativas**

Además de las funciones explicadas anteriormente como la formación y mantenimiento de la mielina o el apoyo en el metabolismo axonal, los oligodendrocitos también influyen en el mantenimiento de la integridad axonal y la supervivencia neuronal (39). Puesto que estas funciones son claves en la neuroprotección, estas células son cada vez más reconocidas como componentes importantes en la patogénesis de trastornos neurodegenerativos, incluyendo las enfermedades priónicas y *prion-like*. Recientemente también se ha relacionado la glía con trastornos neuropsiquiátricos complejos como la esquizofrenia (40), donde también provocan pérdida de oligodendrocitos y mielina (33)(39).

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo general del presente trabajo consiste en observar si el sistema de neuro-protección del individuo, en concreto las células de la glía, en interacción con las neuronas, desempeñan un papel clave en el desarrollo y propagación de las enfermedades neurodegenerativas (priónicas y *prion-like*) basando el estudio en la enfermedad de Scrapie como prototipo de estas patologías. El fin último es determinar una posible diana terapéutica y establecer así una potencial estrategia de tratamiento.

Para ello se plantea como objetivo específico estudiar qué papel desempeña la oligodendroglía en el progreso de la enfermedad de Scrapie valorando sus alteraciones cuantitativas y morfológicas en función del estadio clínico. Se pretende así evaluar la implicación de esta población celular en la evolución del proceso neurodegenerativo para poder extrapolar las conclusiones al resto de enfermedades priónicas y *prion-like*.

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este trabajo se ha llevado a cabo, con el fin de enfocar la introducción al tema, una búsqueda bibliográfica de las principales fuentes biomédicas siendo la fuente principal de búsqueda *Pubmed*, incluyendo algunos de los artículos más relevantes publicados relacionados con el tema de este estudio. Las palabras clave utilizadas para la búsqueda han sido: *Neurodegenerative disease, Prion, Prion disease, Scrapie, Prion-like, Glial cells, Astroglia, Microglia, Oligodendroglia*. Además, se ha realizado un trabajo experimental en el Centro de investigación de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (Universidad de Zaragoza) que a continuación se describe.

Se han estudiado un total de 31 secciones correspondientes a muestras de cerebelo de especie ovina, todas de sexo femenino y con un rango de edad entre 3 y 9 años. En todas las muestras incluye corteza cerebelar (capa molecular, capa de células de Purkinje, capa granular) y sustancia blanca. Por un lado, 23 muestras son procedentes de ovejas afectadas de Scrapie adquirido de forma natural en diferentes estadios clínicos: 7 en estadio preclínico (cuando el animal no presentaba signos clínicos pero presentaba PrP<sup>Sc</sup> en tejido linforreticular por biopsia reticular linfática), 8 en estadio clínico y 8 en fase terminal (cuando el animal estaba exhaustivamente debilitado y postrado). Por otra parte, se utilizaron 8 animales como controles sanos. Además se ha incluido en el estudio diferentes genotipos de PRNP (ARQ/ARQ, ARQ/VRQ, y VRQ/VRQ) (Tabla 3).

Como controles de la técnica se han incluido 4 muestras (una correspondiente a cada uno de los grupos clínicos y control), que no han sido incubadas con el anticuerpo primario (Olig2; Tabla 4). Adicionalmente, como control de especificidad del anticuerpo, dos de las muestras (0-1342 y 0-864) incluían una sección de tejido linfoide (ganglio retrofaríngeo).

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Bienestar Animal de la Universidad de Zaragoza (Nº de referencia: PI 41/16).

**Tabla 3.** Muestras incluidas en el estudio.

Nº muestra	Edad	Sexo	Genotipo	Enfermedad y fase clínica	
1	0-1341	3	F	ARQ/ARQ	Control sano
2	0-1088	3	F	ARQ/ARQ	Control sano
3	0-1763	3	F	ARQ/ARQ	Control sano
4	0-1756	4	F	ARQ/VRQ	Control sano
5	0-1342	4	F	ARQ/VRQ	Control sano
6	0-1761	3	F	ARQ/ARQ	Control sano
7	0-1751	3	F	ARQ/ARQ	Control sano
8	0-1758	4	F	ARQ/ARQ	Control sano
9	0-976	4	F	ARQ/ARQ	Preclínica (P)
10	868	9	F	ARQ/ARQ	Preclínica
11	0-580	3	F	ARQ/ARQ	Preclínica
12	0-895	6	F	ARQ/ARQ	Preclínica
13	0-931	5	F	ARQ/ARQ	Preclínica
14	0-1074	4	F	ARQ/ARQ	Preclínica
15	784	8	F	ARQ/ARQ	Preclínica
16	0-792	5	F	ARQ/VRQ	Clínica (C)
17	0-978	5	F	ARQ/ARQ	Clínica
18	0-862	7	F	ARQ/ARQ	Clínica
19	0-983	6	F	ARQ/ARQ	Clínica
20	0-864	9	F	ARQ/VRQ	Clínica
21	0-392	8	F	ARQ/ARQ	Clínica
22	0-894	9	F	ARQ/ARQ	Clínica
23	0-1145	6	F	ARQ/ARQ	Clínica
24	0-389-19	7	F	ARQ/ARQ	Terminal (T)
25	0-787	9	F	ARQ/ARQ	Terminal
26	977	5	F	ARQ/VRQ	Terminal
27	0-986	6	F	VRQ/VRQ	Terminal
28	0-783	4	F	ARQ/ARQ	Terminal
29	0-919	6	F	ARQ/ARQ	Terminal
30	0-979/19	5	F	ARQ/ARQ	Terminal
31	0-990	4	F	ARQ/ARQ	Terminal

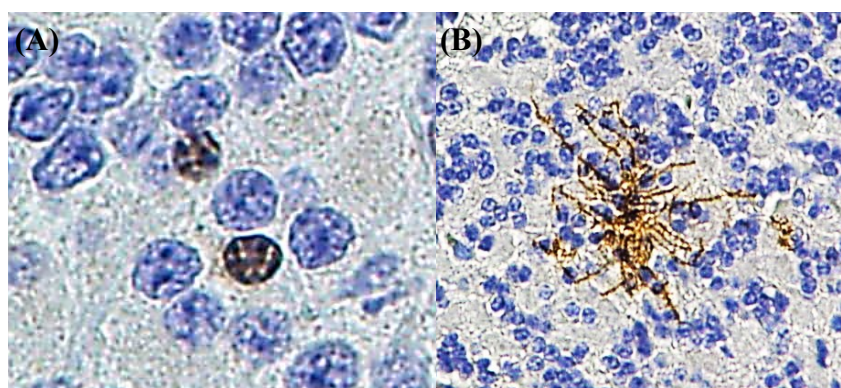
El trabajo en el laboratorio ha consistido en la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) sobre las muestras de especie ovina descritas anteriormente para su posterior observación y análisis con microscopía óptica. A continuación, se resume el protocolo seguido para las muestras (ANEXO 1). Previamente han sido incluidas en parafina, cortadas en secciones de 4-5  $\mu\text{m}$  incubándose durante toda la noche a 56°C. Para empezar, se procede a desparafinar las secciones mediante el protocolo de rutina. Una vez terminado, se someten las muestras a un pretratamiento para el desenmascaramiento del epítipo siguiendo un protocolo específico. En concreto, se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO, Glostrup - *Denmark*), a continuación, se procede a la inmersión de las muestras en citrato buffer (pH básico) durante 20 minutos a 96°C previo lavado con PBS. Una vez finalizado, se deja enfriar en PBS durante 20 minutos y posteriormente se realiza la incubación con *horse serum* 3% durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras este proceso, se incuban las muestras

con el anticuerpo primario específico Olig2 (Abcam, Amsterdam – *Netherlands*: 1/500) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se lavan las muestras con PBS, posteriormente se incuban con el polímero anti-*rabbit* Envision (DAKO) y se lavan de nuevo. Una vez terminado, se revelan las muestras con DAB+ (diaminobencidina) (Envision, DAKO) y se vuelven a lavar en PBS. A continuación, se lleva a cabo el proceso de contra-tinción mediante la inmersión de las muestras en hematoxilina y posteriormente se lavan en agua destilada. Por último, se lleva a cabo un proceso de deshidratación siguiendo el protocolo de rutina. Para acabar el proceso se montan las muestras con DPX y se deja secar a temperatura ambiente hasta ser observadas al microscopio. Para la observación de resultados se ha propuesto un contaje semicuantitativo de todas las muestras donde se puntúa la intensidad de la inmunotinción, desde “-” (ausencia), hasta “+++++” (máxima).

#### 4. RESULTADOS

Una vez puesta a punto la técnica de inmunohistoquímica para el marcador Olig2 se ha procedido a la valoración microscópica de cada una de las muestras con el fin de describir las variaciones cualitativas (relativas a la morfología) y cuantitativas, en este caso siguiendo el sistema de recuento semicuantitativo de tinción específica frente a Olig2 descrito en la sección de *Material y Métodos*. Fueron evaluadas y confirmadas por un observador y supervisadas por un experto independiente, prestando atención a la intensidad y la morfología de inmunotinción en todos los campos microscópicos de cada región del cerebelo.

Se han observado 2 morfologías diferentes. Una de ellas coincide con la descrita en la literatura (41): pequeña, redondeada, de aspecto granular (G). Mientras que la otra presenta un tamaño mayor, de morfología estrellada y ramificada (E) (Figura 4).



**Figura 4:** (A) Inmunotinción frente a Olig2 de morfología pequeña, redonda y de aspecto granular, G, o (B) estrellada y ramificada, E. (x400)

A continuación, se presenta el análisis detallado de los resultados (Tabla 4) y se describen las observaciones más relevantes de cada uno de los grupos valorados, así como de los controles de la técnica incluidos.

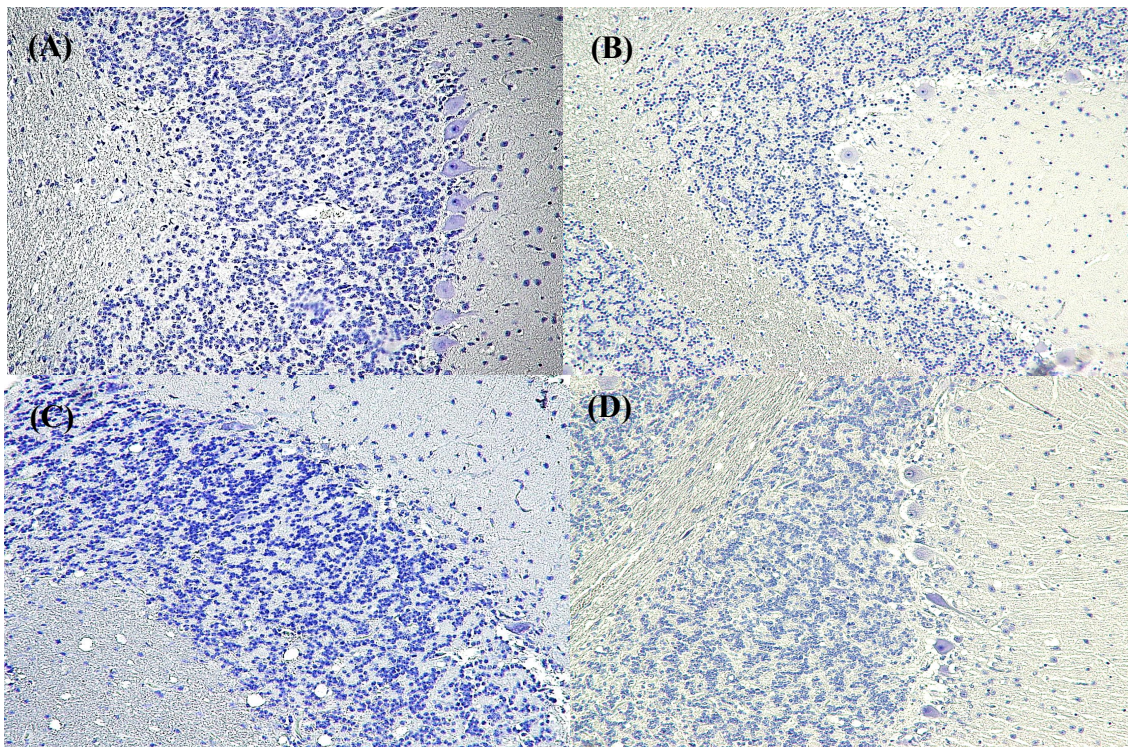
**Tabla 4.** Resultados de la aplicación de IHQ frente a Olig2 en todas las muestras en función de la intensidad y la morfología observadas.

N° muestra	Fase clínica	Ac	Corteza						Sustancia blanca		
			Capa molecular		Capa de células de Purkinje		Capa granular		G	E	
			G	E	G	E	G	E			
1	0-1341	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	0-1341	-	Olig2	+++++	++	-	-	+++++	+	+++++	+++
3	0-1088	-	Olig2	++++	++	-	-	++	++	+	+++
4	0-1763	-	Olig2	++++	++	-	-	+++	++	++	-
5	0-1756	-	Olig2	+++	++++	-	-	++++	+	++	+++++
6	0-1342	-	Olig2	++	+++	-	-	++	+	+	++
7	0-1761	-	Olig2	+++++	++	-	-	+++++	++	+++++	-
8	0-1751	-	Olig2	+++++	++	-	-	+++++	++	+++	-
9	0-1758	-	Olig2	++	+++	-	-	++	++	++	++
10	0-976	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	0-976	P	Olig2	++	-	-	-	++	-	+	-
12	868	P	Olig2	+++	+	-	-	+++	+	+++	++
13	0-580	P	Olig2	++	+++	-	-	++	+	+	+
14	0-895	P	Olig2	-	-	-	-	-	-	-	++
15	0-931	P	Olig2	+	+	-	-	+	+	+	++
16	0-1074	P	Olig2	+	-	-	-	+	-	+	-
17	784	P	Olig2	+++++	-	-	-	+++++	-	+++++	-
18	0-792	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	0-792	C	Olig2	-	-	-	-	-	-	-	-
20	0-978	C	Olig2	+	++++	-	-	-	+++	-	+++
21	0-862	C	Olig2	+	-	-	-	+	-	+	+
22	0-983	C	Olig2	+	+++	-	-	+	+++	+	+++
23	0-864	C	Olig2	+	++	-	-	+	+	+	+
24	0-392	C	Olig2	+	-	-	-	+	-	+	+
25	0-894	C	Olig2	-	++++	-	-	+	++++	-	++++
26	0-1145	C	Olig2	+	++	-	-	++	+	-	++
27	0-389-19	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	0-389-19	T	Olig2	-	-	-	-	-	-	-	-
29	0-787	T	Olig2	-	++	-	-	++	-	-	++
30	977	T	Olig2	-	+	-	-	++	-	-	+
31	0-986	T	Olig2	++	+	-	-	+	+	++	++
32	0-783	T	Olig2	++	+	-	-	+	-	-	+
33	0-919	T	Olig2	+	+	-	-	+	-	+	-
34	0-979/19	T	Olig2	+	-	-	-	+	+	-	+
35	0-990	T	Olig2	-	-	-	-	-	-	+	-



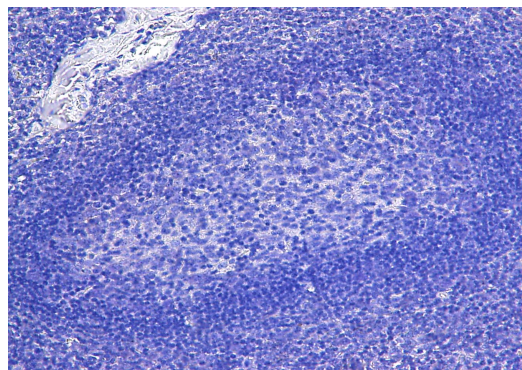
#### 4.1 Controles de la técnica

Como se ha comentado anteriormente, han sido cuatro (O-1341, O-976, O-792 y O-389/19) las muestras utilizadas como control de la técnica (excluyendo la incubación con anticuerpo primario). En todas se observa ausencia de inmunomarcaje frente al marcador Olig2 (Figura 5).



**Figura 5.** *Controles de la técnica. Ausencia de inmunomarcaje frente a Olig2 en las 3 capas de la corteza y sustancia blanca de (A) animal sano, (B) afectado de Scrapie en fase preclínica, (C) clínica y (D) terminal (x100).*

Adicionalmente, en las dos secciones de tejido linfoide valoradas (O-1342 y O-864) también ha sido posible excluir la presencia de inmunomarcaje frente a oligodendroglía, confirmando la especificidad del anticuerpo usado (Olig2; Figura 6).



**Figura 6.** *Control de técnica. Inmunomarcaje negativo en muestra de ganglio retrofaringeo (x200).*

## 4.2 Controles de la enfermedad (animales sanos)

En todas las muestras ha sido posible diferenciar histológicamente la corteza de un cerebelo sano, con sus tres capas de sustancia gris: la capa molecular, capa de células de Purkinje y capa granular, así como la sustancia blanca.

En relación a la inmunotinción frente a Olig 2, se demuestra la presencia de los dos patrones específicos para oligodendroglía definidos al inicio de esta sección. Se localizan tanto en la capa molecular, como en la capa granular y en la sustancia blanca, pero en ninguno de los casos analizados, en la capa de células de Purkinje (Figura 7).

El patrón G es más abundante en la sustancia gris que en la blanca. De las ocho muestras estudiadas, tres de ellas (O-1341, O-1761 y O-1751) alcanzan la mayor intensidad (“+++++”) de esta morfología en ambas capas de la corteza, (Figura 8). En otras tres (O-1088, O-1763 y O-1756) la intensidad se ha visto levemente disminuida (“++++ - +++”). Y en las dos restantes (O-1342 y O-1758) se ha visto una intensidad baja (“++”). Mientras, la intensidad predominantemente observada en la sustancia blanca ha sido baja (“++ - +”).

El patrón E predomina en la capa molecular y en la sustancia blanca, puesto que en la capa granular, sólo se alcanza intensidad baja (“++ - +”). No obstante, tres de las muestras (O-1763, O-1761 y O-1751) han presentado en la sustancia blanca inmunotinción negativa (“-“) para esta morfología y sólo una de ellas (O-1756) alcanzó la máxima intensidad (“+++++”).

## 4.3 Animales afectados de Scrapie. Estadio PRECLÍNICO

En este grupo, en general, se observa una aparente disminución frente al marcador utilizado de ambas morfologías (tanto G como E) en todas las capas de la corteza y también en sustancia blanca (Figura 8). Con respecto a la morfología G, de las siete muestras analizadas, dos de ellas (O-931 y O-1074) presentan una intensidad mínima (“+“) tanto en la corteza como en la sustancia blanca. Sólo uno de los animales analizados (784), alcanza un marcaje positivo alto (“+++++”) en todas las capas, (Figura 7).

Con respecto al patrón E, en tres de las muestras (O-976, O-1074 y 784) no se aprecia inmunomarcaje en ninguna de las capas. De las tres muestras restantes (O-589,

O-895 y O-931), la inmunotinción sólo alcanza la intensidad media (“+++”) en la corteza de una de ellas.

Un individuo (O-895) presenta ausencia de inmunomarcaje (“-“) en todas las capas excepto en la sustancia blanca, en la que se observa una intensidad “++” de la morfología E.

#### **4.4 Animales afectados de Scrapie. Estadio CLÍNICO**

En esta fase clínica, la distribución de patrones morfológicos se invierte, predominando el patrón estrellado (E; Figura 7). En siete de las ocho muestras analizadas en esta fase, el patrón G se encuentra disminuido con una intensidad baja (“++ - +”), tanto en corteza como en sustancia blanca.

Con respecto al patrón E, tres de las muestras (O-978, O-983 y O-894) presentan una intensidad media o alta (“++++ - +++”), tanto en la corteza como en la sustancia blanca. Mientras que en el resto se observa una intensidad baja (“++ - +”) o incluso nula (“-“), esta última predominantemente en sustancia gris (Figura 8).

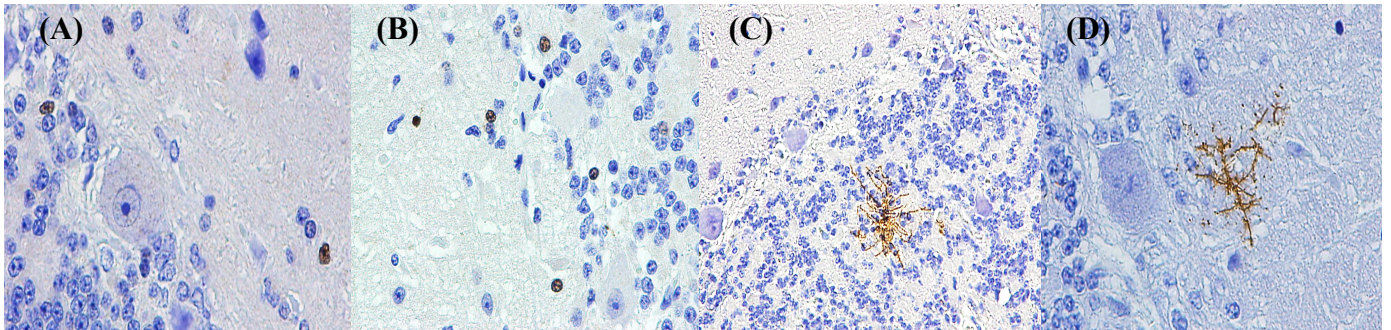
En uno de los individuos (O-792), no se observa inmunomarcaje en ninguna de las capas valoradas.

#### **4.5 Animales enfermos con Scrapie. Estadio TERMINAL**

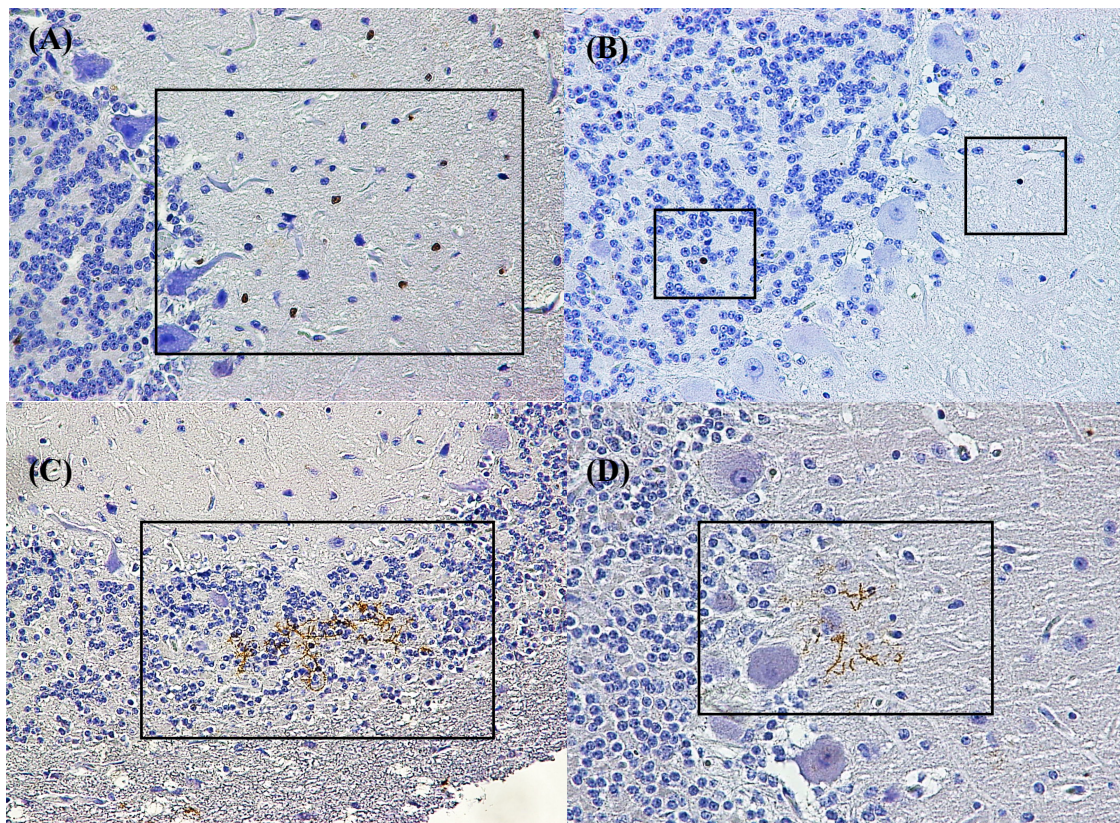
En el conjunto de muestras de este estadio, se observa una evidente disminución de inmunotinción, tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca, (Figura 8). El patrón G, es predominante en la capa glomerular de la corteza. De las ocho muestras analizadas, cuatro presentan inmunomarcaje negativo en la capa molecular, dos en la capa granular y cinco en la sustancia blanca. La intensidad en ambas regiones cerebelares con inmunomarcaje nunca excede el nivel bajo (“++”).

Con respecto al patrón E (Figura7), tres de las muestras presentan inmunomarcaje negativo en la capa molecular, seis en la granular y tres en la sustancia blanca. Al igual que para el patrón característico de oligodendroglía, G, en las muestras con inmunomarcaje positivo la intensidad observada es siempre baja (“++ - +”).

Una de las muestras de este estadio (O-389) presenta inmunotinción negativa (“-”) en todas las regiones analizadas, y otra (O-990) tan sólo una intensidad baja (“+”) de morfología G en la sustancia blanca.



**Figura 7.** Variaciones morfológicas en función del estadio clínico: (A) sujeto sano (x400), o afectado de Scrapie (B) en fase preclínica 0-784 (x400) (C) clínica (x200) y (D) terminal (x400).



**Figura 8.** Variaciones de la intensidad del inmunomarcaje en función del estadio clínico: (A) control sano, o afectado de Scrapie (B) en fase preclínica, (C) clínica y (D) terminal (x200).

Al igual que en los controles de enfermedad (animales sanos), en ningún animal afectado de Scrapie, independientemente del estadio de la enfermedad, se ha observado inmunotinción frente a Olig2 a nivel de la capa de células de Purkinje.

## 5. DISCUSIÓN

A pesar de que en el marco de la teoría actual de la neuroinflamación como causa más probable de la neurodegeneración (42) la neuroglía constituye uno de los principales objetivos de estudio dentro de las patologías neurodegenerativas, el papel de la oligodendroglía ha sido poco estudiado en las patologías neurodegenerativas en general, y en las enfermedades priónicas en particular. Por ello, en este trabajo se valora el papel que desempeña esta población celular en el modelo de Scrapie con el fin de utilizarlo como prototipo de enfermedad y poder así extrapolar las conclusiones al resto de enfermedades neurodegenerativas. Se trata de un primer estudio de aproximación a la determinación del papel de oligodendroglía en el proceso neurodegenerativo, para lo que se utilizan animales en diferentes estadios de la enfermedad de Scrapie. Estudios similares se han desarrollado para determinar la implicación de la astrogliá y la microglía en este mismo modelo (43) y posteriormente confirmados en otras enfermedades priónicas (44) y prion-like (45), evidenciando la utilidad y validez de dicho modelo.

Numerosos estudios sobre la EM nombrada anteriormente establecen a la oligodendroglía como factor clave en la neurodegeneración de la enfermedad. A medida que los oligodendrocitos se deterioran y los axones pierden la vaina de mielina compacta funcional, se puede deducir que hay un fallo en el apoyo metabólico de los oligodendrocitos. Por otra parte, se ha observado que el daño axonal, puede presentarse mucho antes que la desmielinización de los axones lo que sugiere que la pérdida de este apoyo de los oligodendrocitos sea un acontecimiento temprano en la patogénesis. La EM suele presentarse en forma de recaída / remisión, con remielinización y recuperación funcional tras episodios agudos de desmielinización. Sin embargo, la pérdida axonal que caracteriza la fase progresiva de la enfermedad contribuye significativamente a su deterioro y se ha relacionado con el fracaso de la remielinización. En la actualidad, se sabe que en algunos casos, este fracaso se debe a un bloqueo en la diferenciación de los OPC donde Olig1 y Olig2 desempeñan un papel fundamental (46)(34).

También se ha estudiado el impacto de la relación entre la muerte de oligodendrocitos con la muerte de neuronas motoras, ya que como se ha comentado en la sección de *Introducción*, en concreto el gen Olig2 desempeña un papel fundamental

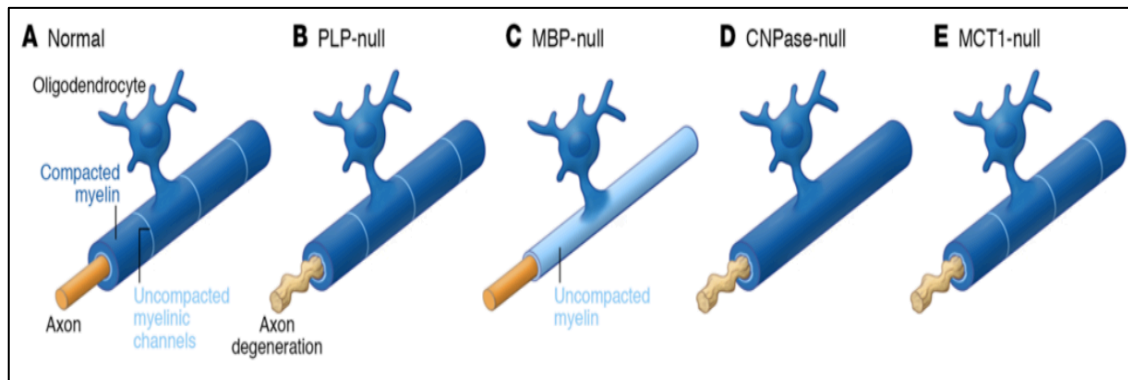
en la diferenciación tanto de los OPC como de las motoneuronas. Esto supuso un papel clave en el estudio de los oligodendrocitos en las enfermedades de la neurona motora como la ELA. En modelos de ratón, la sobreexpresión del gen mutado SOD1<sup>G93A</sup> relacionado con la enfermedad (21), desencadenó la degeneración y muerte de oligodendrocitos. Se observó que la supresión de este gen mutado retrasó significativamente la aparición de la enfermedad y prolongó la supervivencia (47)(37).

Tanto la EM (46) (enfermedad característica desmielinizante) como en la ELA (47) (enfermedad de la neurona motora), esta última enfermedad *prion-like*, han demostrado una relación entre la degeneración axonal y/o muerte neuronal y la degeneración de oligodendrocitos. En concreto, en la EM, se ha visto que existe degeneración axonal incluso sin desmielinización aparente (y por ello, previo a la aparición de la clínica). Esto es debido a un fallo en el apoyo metabólico neuronal de los oligodendrocitos por diversos mecanismos que a continuación se detallan.

Los primeros estudios que indicaron un papel metabólico de los oligodendrocitos analizaban el bloqueo de proteínas específicas de oligodendrocitos expresadas en la mielina compactada o no compactada (Figura 9). La pérdida de la proteína proteolipídica (PLP), específica de los oligodendrocitos, en animales transgénicos, provoca una grave degeneración axonal en ausencia de alteraciones de las propiedades de conducción del axón, siendo aparentemente la estructura de la mielina normal (Figura 9B). Esto sugiere que los axones mielinizados necesitan el apoyo metabólico de los oligodendrocitos para mantener la homeostasis del ATP. En ratones mutantes con neuronas desmielinizadas que carecen de la proteína oligodendrocitaria (MBP), no muestra ningún signo de degeneración, salvo leve inflamación axonal en la capa granular del cerebelo y en sustancia blanca de la médula espinal a pesar de la ausencia de mielina compactada y del bloqueo del potencial de acción (Figura 9C) (37).

A pesar de la incapacidad de la mielina para regular el correcto funcionamiento del potencial de acción, los axones no degeneran, quizás por el apoyo metabólico continuo de la mielina no compactada; sin embargo, estos animales acaban falleciendo alrededor de los 3 meses de edad. En concreto, el fenotipo observado en estos ratones carentes de MBP y PLP sugiere claramente que los oligodendrocitos afectan a la homeostasis neuronal independientemente de la capacidad para proporcionar una conducción axonal normal. Los ratones sin CNPasa desarrollan una degeneración

axonal progresiva con una mielina aparentemente normal que no influye en la propagación del potencial de acción (Figura 9D). Sin embargo, recientemente se ha descrito que la CNPasa está implicada en la organización del citoesqueleto de la actina fundamental en los canales mielínicos descritos anteriormente, por lo que una pérdida de CNPasa afectó gravemente a estos canales produciendo un aumento en la compactación de la mielina (38)(37).



**Figura 9.** Representación del apoyo metabólico de los oligodendrocitos a las neuronas. **(A)** La mielina normal con canales compactados (azul oscuro) y no compactados (azul claro) forma una estructura multilaminar alrededor del axón. **(B)** En animales sin PLP, la mielina parece ultraestructuralmente normal, pero los axones subyacentes muestran signos de degeneración. **(C)** En ratones sin MBP, sólo una fina vaina de mielina no compactada envuelve al axón. A pesar de esta desmielinización, estos ratones se desarrollan normalmente y los axones no presentan degeneración. **(D)** La mielina en ratones sin CNPasa está más compactada de lo normal como resultado de la pérdida de canales mielínicos no compactados, lo que provoca grave degeneración axonal. **(E)** La pérdida de MCT1 en los oligodendrocitos conduce a la degeneración axonal a pesar de la apariencia normal de la mielina. Todos estos modelos muestran una clara distinción entre la capacidad de la mielina para la conducción axonal y su capacidad para proporcionar un apoyo metabólico al axón (37).

Estos modelos revelan efectos diferenciales de la mielina en la propagación del potencial de axón y la degeneración axonal, lo que confirma que los oligodendrocitos poseen un papel esencial en el apoyo metabólico neuronal. Los metabolitos que se transportan a través de los canales citoplasmáticos acaban acumulándose en los oligodendrocitos si no hay un transporte activo que los saque fuera de la célula. De hecho, los oligodendrocitos expresan un transportador específico para los metabolitos derivados de la glucosa que asegura el paso de estos hacia las neuronas para satisfacer las necesidades metabólicas (48)(37).

Hace aproximadamente media década fue cuando se publicó que los oligodendrocitos proporcionan apoyo metabólico a través de transportadores de monocarboxilato. En primer lugar se describió el transportador de monocarboxilato 1, que anteriormente se había encontrado altamente expresado por los astrocitos. Los MCT comprenden una superfamilia de 16 tipos, de los cuales cuatro (MCT1, MCT2, MCT3 y

MCT4) se expresan en el SNC y cada uno tiene una cinética de transporte de sustratos diferente. Es el transportador MCT1 el que se expresa fuertemente por los oligodendrocitos en los canales mielínicos y el que media el apoyo metabólico a las neuronas. La inhibición del receptor MCT1, específico de oligodendrocitos en médula espinal, conduce a una lesión axonal (Figura 9E) (48)(37).

Esto resulta muy interesante y en este estudio podría justificar una lesión oligodendrocitaria por acúmulo de la proteína PrP<sup>Sc</sup> en las enfermedades priónicas. Aunque algunos estudios afirman que los oligodendrocitos son aparentemente resistentes a la infectividad de PrP<sup>Sc</sup> (49), concluyen que sigue siendo posible que la PrP<sup>c</sup> oligodendrocitaria module la velocidad de la neuroinvasión priónica, por lo que podría intervenir en la fisiopatología de las enfermedades priónicas.

Benito *et al* (2018) publicaron un estudio sobre la alteración de la transcripción de los genes que codificaban proteínas específicas para astrocitos y oligodendrocitos en la corteza frontal de la ECJ (prototipo de enfermedad priónica humana). Los genes que seleccionaron incluyen codificadores de proteínas estructurales, genes que participaban en el metabolismo energético y mantenimiento de los axones y genes de conexinas de unión entre oligodendrocitos y astrocitos. El estudio estableció que tanto Olig1 y Olig2 como NG2 (como se indicaba en la sección de *Introducción*, marcador específico de OPC), se encontraban conservados en ECJ. Sin embargo, SLC2A1 (miembro de la familia de transportadores de soluto), y MCT1 (transportador de monocarboxilato 1) entre otros, se encontraron disminuidos significativamente. Este hallazgo apoya la idea de que los déficits moleculares relacionados con el metabolismo energético y el transporte de solutos en astrocitos y oligodendrocitos, además de las neuronas, son relevantes en la patogénesis de las lesiones corticales de los ECJ (50). Así mismo, puede producirse un déficit de estos transportadores oligodendrocitarios conllevando a una degeneración axonal incluso antes de la desmielinización y con ello la aparición de la clínica.

En este estudio se ha visto una aparente disminución del inmunomarcaje frente a Olig2 en el cerebelo de Scrapie que no había sido descrito en estudios anteriores de la ECJ. Serían necesarios más estudios para confirmarlo, pero esta discordancia podría justificarse en base a un comportamiento diferente según la región encefálica puesto que



la corteza cerebral es una de las regiones menos afectadas en las enfermedades priónicas, mientras que el cerebelo es una de las más afectadas.

Por otro lado, esta aparente disminución oligodendrocitaria, junto con el cambio morfológico evidenciado en este estudio (ramificación), se ha comenzado a observar desde la fase incipiente de la enfermedad (estadio preclínico). Sólo en una de las muestras no se observaron aparentes diferencias entre el número ni la morfología oligodendrocitaria en relación con los individuos sanos (controles), sugiriendo que podría tratarse de un individuo en una fase más temprana de la enfermedad, que todavía no evidencia los cambios observados en el resto de casos. De hecho, conforme avanza la enfermedad se sigue observando esa disminución de la oligodendroglía con respecto a los sujetos sanos.

En relación con los cambios morfológicos, la apariencia de la oligodendroglía con largas ramificaciones e inmunomarcaje frente a Olig2 observada en algunos casos en este estudio podría deberse a diferentes teorías que a continuación se detallan.

Por un lado, Shintaku *et al* (2004), publicaron un estudio donde en la sECJ observaron un engullimiento de oligodendrocitos por parte de astrocitos hipertróficos, sobre todo en la sustancia blanca cerebral, en correlación con la gravedad de las lesiones axonales causadas por la enfermedad siendo la naturaleza oligodendroglial corroborada mediante inmunomarcaje con el anticuerpo anti-Olig2 humano (51). En este estudio se ha detectado un marcaje inmunohistoquímico frente a Olig2 en las muestras afectadas de Scrapie con una morfología diferente a la ya descrita en la bibliografía para oligodendroglía (redonda, pequeña y de aspecto granular) que podría asemejarse a la morfología astrocitaria, característicamente estrellada, ubicados tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris (22). De esta manera podría asociarse la tinción observada con oligodendroglía fagocitada por astrocitos hipertróficos. En estudios anteriores (43) se ha demostrado un incremento astrocítico en relación con una mayor lesión axonal de la sustancia blanca cerebral, por lo que al avanzar en el estadio neurodegenerativo, podría aumentar la fagocitosis de oligodendrocitos por parte de la astroglía activa demostrada anteriormente. Esto apoyaría el resultado de nuestro estudio donde la morfología ramificada predomina en la mayoría de las muestras de animales enfermos, tanto en la fase clínica como terminal, a diferencia de la fase preclínica donde la morfología anteriormente descrita, G, es la predominante.

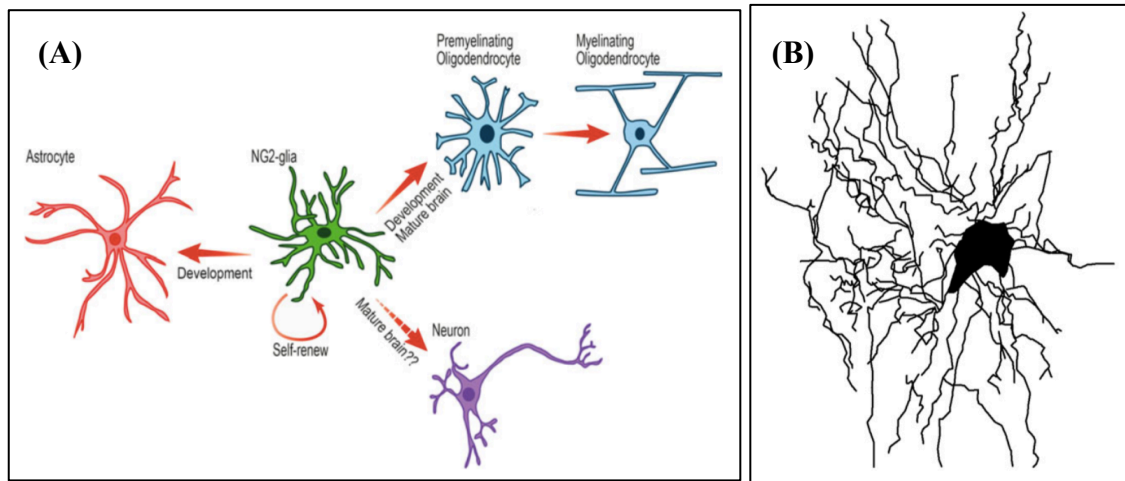
Sin embargo, en el estudio realizado, se observa inmunotinción no sólo en el soma, sino también en las ramificaciones diferenciándose de la imagen observada en el artículo de Shintaku *et al* (2004), donde se identifica claramente la oligodendroglía con inmunomarcaje positivo dentro del citoplasma del astrocito hipertrófico, siendo el núcleo del astrocito negativo para el inmunomarcaje Olig2 (51). Están previstos estudios futuros de co-localización para poder confirmar o descartar esta teoría.

Por otro lado, este cambio morfológico oligodendrocitario consistente en un aumento en sus ramificaciones podría asociarse, de forma similar a la sugerida en el caso de la astroglía (52), a un proceso reparador del tejido dañado por la enfermedad con un objetivo compensatorio frente a la muerte celular asociada a la patología.

La glía NG2 (OPC) es una población en auge de estudio con una morfología muy ramificada. Estudios iniciales sugirieron que su función única es la generación y mantenimiento de oligodendrocitos en el SNC, importante para la correcta mielinización y, por tanto, para el soporte axonal y velocidad de conducción. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un alto potencial en esta estirpe celular para diferenciarse también en otros tipos celulares (Figura 10A), una alta capacidad de mantenimiento de los oligodendrocitos y un comportamiento dinámico en condiciones de patología (53).

Xu *et al* (2015) publicaron un artículo donde hablaban de que los tratamientos basados en trasplantes de células progenitoras de oligodendrocitos humanos pueden reemplazar o remodelar la mielina y, eventualmente, contribuir a la regeneración axonal en lesiones axonales traumáticas. Para ello trasplantaron células progenitoras de oligodendrocitos humanos que expresaban entre otros marcadores, Olig2. Tras el trasplante observaron que estas células no sólo sobrevivieron, sino que migraron masivamente mostrando una preferencia por la sustancia blanca cerebral.

Este tipo celular mostraba una morfología de aspecto muy ramificado más grande que los oligodendrocitos maduros (Figura 10B). Estos hallazgos sugirieron que las OPC pueden llegar a diferenciarse en oligodendrocitos y migrar masivamente a lo largo de tractos de materia blanca ante una lesión axonal difusa, lo que les convierte en candidatas atractivas para las terapias celulares en este tipo de patologías (54).



**Figura 10.** (A) Esquema que representa los diferentes destinos de la NG2-Glía. Su principal capacidad es proliferar y diferenciarse en oligodendrocitos en el cerebro maduro e inmaduro. No obstante, también puede diferenciarse en astrocitos durante el desarrollo y algunos estudios han sugerido que, en el cerebro maduro, la NG2-Glía podría diferenciarse en neuronas, aunque esta afirmación sigue siendo muy criticada (53). (B) Representación de la morfología de la NG2-Glía 3 meses post-trasplante de la zona trasplantada a causa de lesión axonal difusa (54).

Eugenín-von Bernhardt & Dimou (2016), confirmaron más tarde que la NG2-glía cambiaba su dinámica y comportamiento cuando el SNC estaba dañado. Además, esos cambios en diferentes modelos de lesión y desmielinización sugerían que la NG2-glía puede desempeñar un papel activo en la reparación cerebral en condiciones patológicas.

Serían necesarios estudios adicionales para confirmarlo, pero la morfología ramificada que se observa en este estudio podría reflejar esa transición progresiva hacia oligodendrocito a partir de células progenitoras NG2-glía (53) como respuesta neurogénica tras el daño celular producido por la enfermedad priónica, apoyando la hipótesis compensatoria del daño asociado a la patología por parte de la neuroglía, en este caso, de la oligodendroglía.

## 6. CONCLUSIONES

- Tras haber realizado una revisión bibliográfica exhaustiva sobre el tema de este trabajo, es posible afirmar que la visión neurocentrista donde la patología del SNC se centraba en la muerte o supervivencia neuronal ha sido actualmente sustituida por un papel fundamental de la neuroglía en la neuroprotección y neurodegeneración.
- El gen *Olig2*, principal responsable de la diferenciación de los oligodendrocitos, ha resultado ser un marcador útil para valorar las alteraciones cuantitativas y cualitativas de la oligodendroglía en el progreso neurodegenerativo de la enfermedad de Scrapie utilizada como prototipo de las enfermedades priónicas.
- Se ha demostrado una disminución de inmunomarcaje frente a oligodendroglía en animales afectados con Scrapie que iniciaba en el estadio incipiente de la enfermedad y aumentaba conforme avanzaba hacia el estadio terminal, por lo tanto, a estados más avanzados de neurodegeneración.
- Se describe por primera vez en la oligodendroglía un cambio morfológico, principalmente en las muestras de animales en estadios avanzados (clínico y terminal), con largas ramificaciones y forma estrellada. Esta apariencia podría coincidir con la de las células progenitoras NG2-glía, pudiendo reflejar una transición progresiva hacia oligodendrocitos como respuesta neurogénica tras el daño encefálico producido.
- A pesar de que son necesarios estudios adicionales para confirmarlo, los cambios morfológicos y de intensidad observados en este trabajo frente a *Olig2* apoyarían un fallo en el intento oligodendroglial de compensar el daño ante el estímulo patológico del SNC característico de las enfermedades neurodegenerativas, tanto priónicas, como *prion-like*.

## BIBLIOGRAFÍA

---

1. Chen WW, Zhang X, Huang WJ. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). *Mol Med Rep*. 2016 Apr;13(4):3391–6.
2. Schneider K, Fangerau H, Michaelsen B, Raab WH. The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull*. 2008 Dec 16;77(6):343–55.
3. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982 Apr 9;216(4542):136–44.
4. Imran M, Mahmood S. An overview of animal prion diseases. *Virol J*. 2011 Nov 1;8:493.
5. Babelhadj B, Angelo M, Bari D, Pirisinu L, Chiappini B, Bechir S, et al. Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*. 2018 Jun;24(6):1029-1036.
6. Creutzfeldt HG. Über eine eigenartige herdförmige erkrankung des zentralnervensystems (Vorläufige mitteilung). *Zeitschrift für die gesamte Neurol und Psychiatr*. 1920;57(1):1–18.
7. Jakob A. Über eigenartige erkrankungen des zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischen befunde - (Spastische pseudosklerose-encephalomyelopathie mit disseminirten degenerationsherden.). *Zeitschrift für die gesamte Neurol und Psychiatr*. 1921;64(1):147–228.
8. Gambetti P, Dong Z, Yuan J, Xiao X, Zheng M, Alsheklee A, et al. A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*. 2008 Jun;63(6):697–708.
9. Ironside JW, Ritchie DL, Head MW. Prion diseases. *Handb of Clin Neurol*. 2017;145:393-403.
10. Minikel EV, Vallabh SM, Lek M, Estrada K, Samocha KE, Sathirapongsasuti JF, et al. Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med*. 2016 Jan 20;8(322).
11. Prusiner SB, Scott MR, Dearmond SJ, Cohen FE. Prion Protein Biology Review. *Cell*. 1998 May 1;93(3):337–48.
12. Capellari S, Strammiello R, Saverioni D, Kretzschmar H, Parchi P. Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: Insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol*. 2011 Jan;121(1):21–37.
13. Moore RA, Taubner LM, Priola SA. Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol*. 2009 Feb;19(1):14–22.
14. Mabbott NA. How do PrPSc prions spread between host species, and within hosts? *Pathogens*. 2017 Nov 24;6(4):60.
15. Prusiner SD mad cow disease. *Mad Cows*. *Sci Am*. 2004 Jul;291(1):86–93.
16. Garcés M. Estudio morfológico sobre las alteraciones neurogliales en las enfermedades priónicas y prion-like. Tesis Dr. 2019.
17. Cano, R., Sierra, M., Tello O. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Protocolos de enfermedades de declaración obligatoria. *Protoc la Red Nac Vigil Epidemiológica Madrid*. 2015;110–28.
18. Trevitt CR, Collinge J. A systematic review of prion therapeutics in experimental models. *Brain*. 2006 Sep;129(9):2241–65.
19. Jucker M, Walker LC. Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*. 2018 Oct;21(10):1341–9.
20. Smith TW, Anwer U, Degirolami U, Drachman DA. Vacuolar Change in Alzheimer's Disease. *Arch Neurol*. 1987;44(12):1225–8.
21. Saberi S, Stauffer JE, Schulte DJ, Ravits J. Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin*. 2015 Nov;33(4):855–76.
22. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of astroglia. *Physiol Rev*. 2018 Jan 1;98(1):239–389.
23. Von Bartheld CS, Bahney J et al. The Search for True Numbers of Neurons and Glial Cells in the Human Brain. *J comp Neurol*. 2016;524(18):3865–95.
24. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhäuser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*. 2016 Mar;131(3):323–45.
25. Barry DS, Pakan JMP, McDermott KW. Radial glial cells: Key organisers in cns development. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014 Jan;46(1):76–9.
26. Chung WS, Clarke LE, Wang GX, Stafford BK, Chakraborty C, Joung J, et al. Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*. 2013;504(7480):394–400.
27. Sofroniew M V. Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Nov 7;7(2):1–16.
28. Garcés M, Guijarro MI, Vargas A, Badiola JJ, Monzón M. Neuroglial patterns are shared by cerebella from prion and prion-like disorder affected patients. *Mech Ageing Dev*. 2019;184:111176.
29. Toledano A, Álvarez M-I, Toledano-Díaz A. New concepts on the functionality of the nervous system: The revolution of the glial cells. I. The neuro-glial relationships. *An la Real Acad Nac Farm*. 2015;81(1).

30. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2013 Feb;39(1):3–18.
31. Guillot-Sestier, M. V., & Town T. Let's make microglia great again in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm*. 2018;125(5):751-770.
32. Kettenmann H, Verkhratsky A. Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci*. 2008 Dec;31(12):653–9.
33. Peferoen L, Kipp M, van der Valk P, van Noort JM, Amor S. Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system. *Immunology*. 2014 Mar;141(3):302–13.
34. Ligon KL, Fancy SPJ, Franklin RJM, Rowitch DH. Olig gene function in CNS development and disease. *Glia*. 2006;54(1):1–10.
35. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(5):409–19.
36. Morrison BM, Lee Y, Rothstein JD. Oligodendroglia: Metabolic supporters of axons. *Trends Cell Biol*. 2013 Dec;23(12):644–51.
37. Philips T, Rothstein JD. Oligodendroglia: Metabolic supporters of neurons. *J Clin Invest*. 2017 Sep 1;127(9):3271–80.
38. Snaidero N, Velte C, Myllykoski M, Raasakka A, Ignatev A, Werner HB, et al. Antagonistic Functions of MBP and CNP Establish Cytosolic Channels in CNS Myelin. *Cell Rep*. 2017;18(2):314–23.
39. Bankston AN, Mandler MD, Feng Y. Oligodendroglia and neurotrophic factors in neurodegeneration. *Neurosci Bull*. 2013 Apr;29(2):216–28.
40. Mauney SA, Pietersen CY, Sonntag KC, Woo TUW. Differentiation of oligodendrocyte precursors is impaired in the prefrontal cortex in schizophrenia. *Schizophr Res*. 2015 Dec;169(1–3):374–80.
41. Del Rio Hortega P. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglía. *MemReal Soc Espan Hist Nat*. 1928;40:40–122.
42. Ransohoff RM. How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*. 2016 Aug 19;353(6301):777–83.
43. Hernández RS, Sarasa R, Toledano A, Badiola JJ, Monzón M. Morphological approach to assess the involvement of astrocytes in prion propagation. *Cell Tissue Res*. 2014;358(1):57–63.
44. Monzon M, Hernandez RS, Garcés M, Sarasa R, Badiola JJ. Glial alterations in human prion diseases: A correlative study of astroglia, reactive microglia, protein deposition, and neuropathological lesions. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(15):e0320.
45. Garcés M, Guijarro MI, Vargas A, Badiola JJ, Monzón M. Neuroglial patterns are shared by cerebella from prion and prion-like disorder affected patients. *Mech Ageing Dev*. 2019 Oct;184:111176.
46. Chang A, Nishiyama A, Peterson J, Prineas J, Trapp BD. NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J Neurosci*. 2000 Sep 1;20(17):6404–12.
47. Kang SH, Li Y, Fukaya M, Lorenzini I, All. E. Degeneration and impaired regeneration of gray matter oligodendrocytes in amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci* 2013 May;16(5):571–9.
48. Lee Y, Morrison BM, Li Y, Lengacher S, Farah MH, Hoffman PN, et al. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature*. 2012 Jul 26;487(7408):443–8.
49. Prinz M, Montrasio F, Furukawa H, Van Der Haar ME, Schwarz P, Rüllicke T, et al. Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J Neurosci*. 2004 Jun 30;24(26):5974–81.
50. Andres Benito P, Dominguez Gonzalez M, Ferrer I. Altered gene transcription linked to astrocytes and oligodendrocytes in frontal cortex in Creutzfeldt-Jakob disease. *Prion*. 2018;12(3–4):216–25.
51. Shintaku M, Yutani C. Oligodendrocytes within astrocytes (“emperipolesis”) in the white matter in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*. 2004 Jul 3;108(3):201–6.
52. Guijarro IM, Garcés M, Andrés-Benito P, Marín B, Otero A, Barrio T, et al. Assessment of glial activation response in the progress of natural Scrapie after chronic dexamethasone treatment. *Int J Mol Sci*. 2020;21(9).
53. Eugenin-von Bernhardt J, Dimou L. NG2-glia, more than progenitor cells. *Adv Exp Med Biol*. 2016;949:27–45.
54. Xu L, Ryu J, Hiel H, Menon A, Aggarwal A, Rha E, et al. Transplantation of human oligodendrocyte progenitor cells in an animal model of diffuse traumatic axonal injury: Survival and differentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2015 May 14;6(1):93.



## **ANEXO 1. PROTOCOLO INMUNOHISTOQUÍMICO**

---

Las muestras han sido previamente incluidas en parafina, cortadas en secciones de 4-5  $\mu\text{m}$  e incubadas durante toda la noche a 56°C.

1. Proceso de desparafinar/hidratar:

Xilol: 5 min (x2)

Etanol 99%: 5 min (x2)

Etanol: 96%: 3 min

Etanol 70%: 3 min

Lavado con agua destilada (5min)

2. Pretratamiento para el desenmascaramiento del epítipo:

Bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO, Glostrup – *Denmark*, *peroxidase blocking solution*; 5 min).

Lavado en PBS buffer (5 min) (x2).

PT Link citrato buffer de pH básico (20 min a 96°C).

Lavado en PBS buffer (20 min).

*Horse serum* al 3% (2 horas a T<sup>a</sup> ambiente).

3. Incubación del anticuerpo primario (Olig2; Abcam, Amsterdam – *Netherlands* 1/500) (4°C toda la noche).

Lavado en PBS 5 min (x3).

4. Incubación con el polímero anti-rabbit Envision (DAKO) (30 min a T<sup>a</sup> ambiente)

Lavado en PBS 5 min (x3).

5. Revelado con DAB+ (diaminobencidina; Envision-DAKO, 1gota/ml buffer; 10 min)

Lavado en PBS 5 min (x3).

6. Contra-tinción con hematoxilina (10 min)

Lavado con agua destilada.

7. Proceso de deshidratación:

Alcohol 70°: inmersión (x3)

Alcohol 96°: inmersión (x3)

Alcohol 100°: inmersión (x3)

Alcohol 100°: inmersión (x3)

Xilol: inmersión (x3)

8. Montaje en porta con DPX y secado (T<sup>a</sup> ambiente)