

TESIS DE LA UNIVERSIDAD
DE ZARAGOZA

2021

209

Moisés Garcés Ayuba

Estudio morfológico sobre las
alteraciones neruogliales en las
enfermedades priónicas y prion-
like

Director/es

Monzón Garcés, Marta
Badiola Diez, Juan José

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

ISSN 2254-7606



Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606





Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO MORFOLÓGICO SOBRE LAS
ALTERACIONES NERUOGLIALES EN LAS
ENFERMEDADES PRIÓNICAS Y PRION-LIKE

Autor

Moisés Garcés Ayuba

Director/es

Monzón Garcés, Marta
Badiola Diez, Juan José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2019

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE.....	3
1 ABREVIATURAS.....	10
2 RESUMEN	12
3 ABSTRACT.....	14
4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
4.1 Las enfermedades priónicas	16
4.1.1 Generalidades.....	16
4.1.2 El agente etiológico	18
4.1.3 Bases moleculares de las enfermedades priónicas humanas.....	19
4.1.4 Diagnóstico de las enfermedades priónicas humanas	23
4.1.4.1 Criterios de clasificación para el diagnóstico	24
4.1.4.2 Criterio de laboratorio o pruebas complementarias	25
4.1.4.2.1 Estudio genético	26
4.1.4.2.2 Análisis de la proteína 14-3-3 en el líquido cefalorraquídeo (LCR).....	26
4.1.4.2.3 Detección de la PrP ^{Sc} en LCR	26
4.1.4.2.4 Electroencefalograma (EEG).....	26
4.1.4.2.5 Imagen o tomografía por resonancia magnética nuclear(RMN)	27
4.1.4.2.6 Estudio anatomopatológico	28
4.1.4.3 Criterio epidemiológico	30
4.1.4.4 Técnicas de diagnóstico auxiliares para la detección de priones	31
4.1.5 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob	31
4.1.5.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (eECJ)	32
4.1.5.1.1 Subtipo MM1/MV1:.....	34
4.1.5.1.2 Subtipo VV2	34
4.1.5.1.3 Subtipo MV2K	35
4.1.5.1.4 Subtipo VV1	35
4.1.5.1.5 Subtipo MM2T	36
4.1.5.1.6 Subtipo MM2C.....	36
4.1.5.1.7 Subtipo p-MM1	36
4.1.5.1.8 Subtipos Mixtos	37
4.1.5.2 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética (gECJ)	37
4.1.5.3 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iECJ).....	40
4.1.5.3.1 ECJ asociado a trasplante de dura madre (dECJ).....	40
4.1.5.3.2 ECJ asociado a hormona de crecimiento humana (hGHECJ)	41
4.1.5.4 Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)	42
4.1.6 Prionopatía variablemente sensible a proteasa (PVSPr)	44
4.2 Enfermedades prion-like	46
4.2.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)	49
4.2.2 Enfermedad de Parkinson (EP)	55
4.2.3 Enfermedad de Huntington (EH)	57
4.2.4 Demencia Frontotemporal (DFT).....	59

ÍNDICE

4.2.5	Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)	65
4.3	Neuroglía	67
4.3.1	Astroglía	68
4.3.1.1	Astrogliosis	71
4.3.1.2	Microglía	73
4.3.1.3	Activación microglial	74
4.3.2	Neuroglía en las enfermedades neurodegenerativas	76
4.3.2.1	Astroglía en las enfermedades priónicas	76
4.3.2.2	Microglía en las enfermedades priónicas	77
4.3.2.3	Neuroglía en enfermedades <i>prion-like</i>	79
5	OBJETIVOS	81
6	RESULTADOS	82
6.1	<i>GLIAL ALTERATIONS IN HUMAN PRION DISEASES: A CORRELATIVE STUDY OF ASTROGLIA, REACTIVE MICROGLIA, PROTEIN DEPOSITION AND NEUROPATHOLOGICAL LESIONS</i>	83
6.1.1	<i>Abstract</i>	84
6.1.2	<i>Introduction</i>	85
6.1.3	<i>Materials and Methods</i>	86
6.1.4	<i>Results</i>	91
6.1.5	<i>Discussion</i>	98
6.2	<i>MORPHOLOGICAL CHANGES OF GLIA IN PRION AND A PRION-LIKE DISORDER</i>	104
6.2.1	<i>Abstract</i>	105
6.2.2	<i>Introduction</i>	106
6.2.3	<i>Materials and Methods</i>	107
6.2.4	<i>Results</i>	108
6.2.5	<i>Discussion</i>	111
6.3	<i>SIMILAR PATTERNS OF ACTIVATED NEUROGLIA ARE SHARED BY PRION AND PRION-LIKE DISORDERS</i>	113
6.3.1	<i>Abstract</i>	114
6.3.2	<i>Introduction</i>	115
6.3.3	<i>Materials and Methods</i>	116
6.3.4	<i>Results</i>	118
6.3.5	<i>Discussion</i>	123
6.4	<i>MORPHOLOGICAL STUDIES FOR ASSESSMENT OF GLIAL ALTERATIONS IN ORDER TO DETERMINE THEIR POTENTIAL ASSOCIATION WITH DIFFERENT PRION TYPES</i>	126
6.4.1	<i>Abstract</i>	127
6.4.2	<i>Introduction</i>	128
6.4.3	<i>Material and methods</i>	130
6.4.4	<i>Results</i>	133
6.4.5	<i>Discussion</i>	143
7	CONCLUSIONES	147
8	BIBLIOGRAFÍA	149

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Encefalopatías espongiiformes transmisibles animales	17
Tabla 2.- Enfermedades priónicas humanas.....	18
Tabla 3.- Características identificativas de los subtipos de eECJ	33
Table 4.- Scores provided by light microscopy examination corresponding to each layer from each cerebellar sample for spongiosis after HE staining (according to the number of vacuoles: -, absence / +++, very high number in grey matter) or immunolabelling for each specific marker used after IHC processing (by evaluating the density and the extension of the labelling deposits: -, negative / +++, maximum).....	91
Table 5.- Clinical data of CJD affected patients.....	130
Table 6.- Correlation among spongiosis, PrP ^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis in all CJD types analysed in the study (Pearson's correlation).....	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Clasificación de los tipos de eECJ y su relación con las diferentes clasificaciones de PrP ^{Sc} según sus patrones de glicosilación y polimorfismos del codón 129.....	20
Figura 2.- Relación entre las clasificaciones de los tipos de PrP ^{Sc} asociados a ECJ establecidas por los grupos de Parchi y Collinge.....	22
Figura 3.- Patrones de glicosilación obtenidos para PVSP _r y eECJ. Las bandas en negro representan los fragmentos detectados por anticuerpos frente a N-terminal; en gris, el fragmento reconocido por anticuerpos frente a C-terminal. La banda <i>Internal f</i> (gris oscuro) representa 2 fragmentos diferentes concomitantes de 7 kDa para anticuerpos diferentes frente a N-terminal y C-terminal.....	23
Figura 4.- Criterios diagnósticos para los diferentes tipos de ECJ1) eECJ 2) iECJ 3) gECJ 4) vECJ	25
Figura 5.- EEG de paciente de eECJ subtipo MV1. Grabaciones documentadas desde 234 hasta 57 días antes de la muerte.....	27
Figura 6.- RMN mostrando el "signo del pulvinar" en un caso de vECJ, en el que se observa una hiperintensidad del núcleo caudado y putamen, pero una intensidad mucho mayor en la región talámica posterior	28
Figura 7.- Esquema del gen <i>PRNP</i> con los <i>loci</i> de las mutaciones descritas.....	38
Figura 8.- Diferentes depósitos de A β teñidos mediante H/E (A y C) o IHQ frente a A β (B, D y F). (A y C) Placa senil, con centro (*) denso que se tiñe con rojo congo y flechas indicando los límites de la placa (C y D) <i>Cotton-wool plaques</i> (E) Placa difusa (F) <i>Ghost tangle</i> como depósito extracelular	52
Figura 9.- Ilustración de la patología neurofibrilar teñida con (A y B) H/E o (C - F) IHQ frente a tau (A) Ovillo neurofibrilar dentro de una neurona (flecha) (B) <i>Ghost tangle</i> (C) Ovillo neurofibrilar de tau en el soma neuronal (flecha grande) y en las dendritas (flecha pequeña) (D) <i>Tangle-associated neuritic cluster</i> (E) Corona de placa senil (F) Proceso neuronal relleno de proteína tau.....	53
Figura 10.- AAC teñida por inmunohistoquímica (IHQ) frente a A β en diferentes localizaciones (A) En la pared arterial y parénquima perivascular (macroangiopatía) (B) En capilares (microangiopatía).....	54

ÍNDICE

Figura 11.- Otros cambios neuropatológicos asociados a la EA (A) Degeneración granulovacuolar, gránulos eosinofílicos rodeados de un halo blanco tenidos con H/E (B) Gránulos perisomáticos teñidos con IHQ frente a ubiquitina.....	55
Figura 12.- Lesiones histopatológicas típicas de EP tenidas con H/E (A-C) Cuerpos de Lewis, estructuras eosinofílicas rodeadas de un halo localizado en neuronas del núcleo motor del nervio vago y la sustancia negra. (D-F) Cuerpos pálidos, carentes de halo.....	56
Figura 13.- Inmunohistoquímica frente a α -sinucleína. (A) Cuerpo de Lewis en una neurona del nervio vago. (B) Gránulos en una neurona de la sustancia negra. (C) Inclusión en una neurona de la amígdala.	57
Figura 14.- Inmunohistoquímica frente a huntingtina en el cuerpo estriado	59
Figura 15.- Correlación entre los subtipos clínico y neuropatológicos dentro del espectro de la DFT	60
Figura 16.- Cuerpos de Bunina teñidos mediante (a) H/E en una neurona del cuerno anterior de la espina dorsal (b) Técnica Kluver-Barrera (c) IHQ frente a cistatina C (d) Detalle de c).....	66
Figure 17.- The scoring system used after H/E staining to assess spongiosis by light microscopy, according to the number of vacuoles: from A) very scarce to D) very abundant (++++)......	87
Figure 18.- The scoring system used after IHC protocols to evaluate the density and the extent of the labelled deposits (brown; hematoxylin counterstaining, blue) by light microscopy: from minimum to maximum, for PrP ^{Sc} (A - D); GFAP (E – H); and reactive microglia (I - L).....	88
Figure 19.- Immunohistochemical patterns observed when each marker (brown; hematoxylin counterstaining, blue) was assessed. For PrP ^{Sc} : A) linear, B) plaques, C) spots, D) coalescent, and E) granular. Scale bars: 20 μ m in A; 50 μ m in B - E. For GFAP: F) stellate, G) perineuronal, and H) radial. Scale bars: 50 μ m in F and H; 20 μ m in G. For reactive microglia: I) ramified and J) amoeboid.	89
Figure 20.- Primary histopathological findings observed by light microscopic examination after H/E staining. A) Control samples did not show spongiosis in any cases. B) A total degeneration of the granular layer was found in one control, as illustrated, and in three CJD cases. C) An evident decrease in the nuclei count and neurite thickening were frequently observed in Purkinje cells from CJD compared with D) control cerebella. E) Protein aggregates were clearly evident in the Purkinje cell layer (on the left) and in the molecular layer (on the right) in several prion-affected cerebella. F) Kuru plaques were only found in the cerebellum from one CJD patient.	94
Figure 21.- Primary observations provided by light microscopic examination after the application of the IHC protocol for PrP ^{Sc} detection (brown; hematoxylin counterstaining, blue). A) Purkinje cell layer and white matter from CJD cerebella always corresponded with the lowest intensity of protein deposit immunolabelling. B) Protein aggregates were not always associated with PrP ^{Sc} immunostaining. C) PrP ^{Sc} deposits were never observed in healthy controls. Scale bars: 50 μ m in A; 20 μ m in B; 200 μ m in C.	95
Figure 22.- Primary observations provided by light microscopic examination after the application of the IHC protocol for GFAP detection (brown; hematoxylin counterstaining, blue). A) The increase in GFAP immunostaining in CJD cerebella was especially evident around Purkinje cells and B) white matter compared to those from healthy controls, C) and D), respectively. E) Protein aggregates always appeared associated with astroglial immunostaining. F) GFAP immunolabelling was evident next to the meninges in some CJD samples. G) An intense radial gliosis in the molecular layers was primarily found in CJD cerebella with higher GFAP	

ÍNDICE

intensity. H) Meanwhile, a large number of varicose fibers parallel to the pial surface were observed in CJD cerebella with lower GFAP intensity. Scale bars: 50µm in A, C, G, and H; 200µm in B and D; 20 µm in E; 100 µm in F.	96
Figura 23.- Primary observations provided by light microscopic examination after application of the IHC protocol for reactive microglia detection (brown; hematoxylin counterstaining, blue). A) An amoeboid morphology was found in a degenerated granular layer. B) Purkinje cells were not found to be in close association with reactive microglia. Ramified morphology was primarily observed in this cell layer. C) Meanwhile, amoeboid shapes were more frequently found in white matter. Scale bars: 50µm in A; 20 µm in B and C.	97
Figura 24.- Images obtained by confocal microscopy for the detection of both types of glial cells assessed in this study showed a more extensive interaction between microglia (red) and astroglia (green) in cerebella from A) CJD patients than in B) control patients (objectives: 10x, NA-03, capturing ROI and CROP scan).	98
Figura 25.- GFAP detection by immunohistochemistry in cerebella from AD (A), CJD (B) and control (C) cases show an evident increase of immunolabeling around Purkinje cells	108
Figura 26.- GFAP immunolabelling in cerebella evidenced two different astroglial profiles in the molecular layer from samples affected by both pathologies, AD (A and C) and CJD (B and D), respectively: a radial profile when high GFAP intensity (A and B) or a horizontal profile when lower GFAP intensity were detected (C and D). GFAP immunolabelling in cerebella from control cases are also showed.	109
Figura 27.- GFAP immunolabeling was always detected in association with protein aggregates in AD (A) and CJD samples(B)	109
Figura 28.- GFAP immunostaining appeared next to meninges in AD (A) and CJD (B) cerebella in many occasions.	110
Figura 29.- Reactive microglia immunostaining in cerebellum differs depending on the pathology studied: scarce, mostly ramified and located in white matter from AD samples (A); or abundant, combined ramified -amoeboid and extended over all the layers from CJD patients (B).	110
Figura 30.- Illustration of histopathological findings by optical microscopy (haematoxylin - eosin staining, HE) (A) Granular layer degeneration was observed in some cases, as shown here in a Frontotemporal dementia (FTD) specimen. (B) Decrease and swelling of Purkinje cells were very often observed, as shown in a Parkinson's disease (PD) specimen. (C) Typical vacuolation associated with prion disease is evidenced in a Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) specimen. (D) Vacuolation presenting an irregular morphology distinguishable from that typically found in CJD is shown in an FTD specimen. (E) No vacuolation was found in the control specimen. (F) Protein aggregates found in the molecular layer from a PD specimen.	118
Figura 31.- Astroglial immunostaining was always detected surrounding protein aggregates in Purkinje cells or molecular layers from (A) Alzheimer's disease, AD, (B) PD, (C) Huntington's disease, HD, (D) FTD, (E) Motor neuron disease, MND and (F) CJD-affected cerebella.	119
Figura 32.- Immunohistochemical pattern distribution observed when astroglial (GFAP) or reactive microglial (CD68 + MHC II) markers were assessed in sagittal cerebella corresponding to AD, PD, HD, FTD, MND and CJD as well as control specimens are shown.	120
Figura 33.- Astroglia and microglia scores between groups (AD, PD, HD, FTD, MND CJD and control) in different layers are compared. Y axes represent semi-quantitative scale mean, and bars represent ±SE	122

ÍNDICE

Figura 34.- Spongiosis, PrP ^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in different layers from cerebellum are compared and drawn in box plots.....	134
Figura 35.- Spongiosis, PrP ^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in different layers from frontal cortex are compared and drawn in box plots.....	134
Figura 36.- Haematoxylin eosin staining (H/E) showing A) Healthy control. B) Spongiosis in a typical spongiform change associated to CJD. C) Spongiosis status compatible with panencephalopathic CJD.....	135
Figura 37.- A) Florid plaque in frontal cortex in iCJD sample. B) Kuru plaque in molecular layer in sCJD sample. C) Unicentric plaque with a PrP ^{Sc} halo surrounding a core in vCJD sample. D) Unicentric plaque in iCJD case. E) Miniplaques in the molecular layer of cerebellum of VPSP case.....	135
Figure 38.- Spongiosis, PrP ^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in cerebellum from different prion types are compared and drawn in box plots.....	136
Figure 39.- Spongiosis, PrP ^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in frontal cortex from different prion types are compared and drawn in box plots.....	137
Figure 40.- Immunohistochemical patterns observed when astroglial marker (GFAP) was assessed in sagittal cerebella corresponding to each CJD subtypes as well as control specimens.....	138
Figura 41.- A) NG2 and B) PrP^{Sc} immunostaining in molecular layer from a vCJD cerebellum.	139
Figura 42.- Different morphological changes of interlaminar astroglia in CJD cases A) Interlaminar astroglia in healthy control B) Replacement of interlaminar astroglia by typical stellate astroglial cells matching with increase of astrogliosis. C) Increase of number of terminal masses of interlaminar astroglia D) Increase of diameter of terminal masses. E) Disruption of interlaminar glia in I – III frontal cortex CJD F) Atypical case of increased thickening of interlaminar astroglia in panencephalopathic CJD	140
Figure 43.- Glial cells associated to protein deposits. A) Astrocytic process associated to Kuru plaque in granular layer of cerebellum. B) Microglial process associated to protein aggregation or clustered morphology associated to protein deposit.....	140
Figure 44.-	
Figure 45.- Microglial morphology found in CJD frontal cortex. A) Amoeboid B) Rod-like	141
Figure 46.- An evident increase of astroglial filaments were found to be associated with (a) vacuolation, b) tubulovesicular structures c) multivesicular bodies d) membrane proliferation, e) alteration of myelin and increase f) disorganization of flattened cisterns.....	143

ÍNDICE

ABREVIATURAS

1 ABREVIATURAS

D	
dECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob asociado a trasplante de duramadre
DFT	Demencia frontotemporal
DFTL	Degeneración frontotemporal lobar
DFTL-FET	Degeneración frontotemporal lobar asociada a proteínas FET
DFTL-TAU	Degeneración frontotemporal lobar asociada a proteína TAU
DFTL-TDP	Degeneración frontotemporal lobar asociada a proteína TDP
DFTL-UPS	Degeneración frontotemporal lobar asociada a proteínas UPS
E	
EA	Enfermedad de Alzheimer
ECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
EEB	Encefalopatía espongiforme bovina
eECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica
EET	Encefalopatía espongiforme transmisible
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
EEG	Electroencefalograma
EH	Enfermedad de Huntington
F	
FET	Familia de proteínas a la que pertenecen las proteínas FUS, EWS y TAF15
FUS	<i>RNA-binding protein fused in sarcoma</i>
FTD-MND	Demencia frontotemporal asociada a la enfermedad de la motoneurona
G	
gECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
H	
H/E	Hematoxilina/eosina
I	

ABREVIATURAS

iECJ	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica
M	
MND	Enfermedad de la motoneurona
N	
R	
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	
SNC	Sistema nervioso central
SOD1	Superóxido dismutasa 1
T	
TDP-43	<i>TAR DNA-binding protein 43</i>
P	
PRNP	Gen de la proteína prión
PrP ^C	Proteína prión celular
PrP ^{Sc}	Proteína prión patológica (Scrapie)
V	
vECJ	Variante de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
vPsPr	Prionopatía variablemente sensible a la proteasa
W	
WB	<i>Western-blot</i>

2 RESUMEN

Las enfermedades priónicas son un grupo de enfermedades neurodegenerativas cuya patogenia todavía no es bien conocida, y frente a las que actualmente no existe ningún tratamiento, más allá de cuidados paliativos. Su diagnóstico definitivo requiere siempre la caracterización a nivel histopatológico de vacuolización, muerte neuronal, depósitos de proteína prión patológica (PrP^{Sc}) y gliosis en regiones específicas del sistema nervioso central. Hasta no hace mucho la mayoría de los estudios neuropatológicos se han centrado en el daño neuronal y el depósito de PrP^{Sc} para intentar comprender mejor el progreso de estas patologías, considerando las alteraciones gliales como un hallazgo secundario o consecuente al proceso patológico. Sin embargo, en las últimas décadas ha emergido la hipótesis de la neuroinflamación como posible causante del proceso neurodegenerativo. Según esta hipótesis la neuroglía, por sus propiedades inmunológicas y de protección, posee un papel central. Pero además, se considera que en determinadas condiciones podría actuar de forma dañina exacerbando el daño sobre el tejido nervioso que trata de proteger. Así, el auge de la hipótesis neuroinflamatoria asociada a desórdenes neurodegenerativos sitúa a las células gliales, principalmente a la astrogliá y la microglía, en el foco de los estudios dirigidos a establecer una posible diana terapéutica capaz de frenar o ralentizar la neurodegeneración.

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que las enfermedades neurodegenerativas comparten una característica común que es la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas o aberrantes. Se ha demostrado también que tienen en común diversos aspectos a nivel histopatológico y molecular, por lo que se han denominado enfermedades *prion-like*. Este hecho ha convertido las enfermedades priónicas en un modelo válido para tratar de comprender el proceso patogénico de la neurodegeneración en todas estas proteinopatías.

En esta tesis, se han llevado a cabo diversos estudios que analizan de forma exhaustiva los cambios morfológicos de las poblaciones astrocíticas y microgliales en pacientes afectados por diversas enfermedades neurodegenerativas. En concreto, por la enfermedad priónica humana más frecuente (enfermedad de Creutzfeldt Jakob), y las enfermedades *prion-like* que incluyen la enfermedad de Alzheimer, de Parkinson o de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica y la demencia frontotemporal. El objetivo es definir las variaciones morfológicas de estas células gliales para conocer su comportamiento durante el proceso neurodegenerativo.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La principal conclusión del trabajo es que se confirma que los cambios observados en la morfología de ambas poblaciones gliales reflejan su implicación en el proceso neurodegenerativo, probablemente, de forma conjunta.

Uno de los resultados más relevantes en relación con la astrogía es que existen unos patrones específicos en la capa molecular del cerebelo que comparten todas las patologías estudiadas, tanto priónicas como prion-*like*. Incluso, independientemente del tipo o cepa causal del caso valorado. Por su morfología parecen tratarse de células con capacidad neurogénica, lo que sugiere un intento de reparación del daño. Pero se requieren estudios adicionales para confirmarlo.

Además, dos alteraciones gliales se han descrito por primera vez en las enfermedades priónicas. En relación con los astrocitos, un tipo peculiar de la corteza frontal denominado glía interlaminar muestra varias alteraciones morfológicas que sólo habían sido descritas en la enfermedad de Alzheimer. En relación con la microglía, un tipo específico conocido como distrófica, aparece en la corteza frontal de pacientes afectados por este grupo de enfermedades, cuando sólo había sido observado en personas sanas ancianas.

3 ABSTRACT

Prion diseases are a group of neurodegenerative diseases whose pathogenesis is not well-known. Nowadays, there is no treatment beyond palliative cares. Its definitive diagnosis always requires the characterization of vacuolization, neuronal loss, pathological prion protein (PrP^{Sc}) deposits and gliosis at histopathological level. So far, most of neuropathological studies have been focused on neuronal damage and PrP^{Sc} deposit in order to try to better understand its progress, considering glial morphological changes as secondary findings or a consequence of the pathogenic process. However, neuroinflammatory hypothesis has emerged some decades ago in order to explain the pathogenesis of neurodegenerative disease. According to this hypothesis, neuroglia, due to its immunological and protective properties, has a pivotal role. Furthermore, it is suggested that in certain conditions glial cells could act in a harmful way exacerbating the damage for nervous tissue initially protected. Thus, the neuroinflammatory hypothesis associated with neurodegenerative disorders places glial cells, mainly astroglia and microglia, at the focus of studies aimed to establish a possible therapeutic target capable of slowing down or backing away neurodegeneration.

On the other hand, recent histopathological and molecular studies have proposed these diseases as more and more acceptable models to understand the pathogenesis of other neurodegenerative diseases better, since they are also characterized by different specific abnormal protein deposits, thus coining the term “proteinopathies”.

In the experimental studies of this doctoral thesis, the similarities and variability of morphological changes of astroglial and microglial populations of different patients affected by distinct neurodegenerative diseases have been analysed in different brain regions, with the aim of determining how these cells behave over the neurodegenerative process. For that purpose, representative samples of the main prion diseases (Creutzfeldt Jakob disease) and other common neurodegenerative diseases (Alzheimer disease, Parkinson disease, Huntington disease, Amyotrophic lateral sclerosis and Frontotemporal dementia) have been included.

The main conclusion of the work consists of that the changes observed in the morphology of both glial populations are confirmed to reflect their involvement in the neurodegenerative process, probably jointly.

One of the most relevant results in relation to astroglia is that there are specific patterns in the molecular layer of the cerebellum that share all the pathologies studied, both prion and prion-

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

like. Even, regardless of the type or causal strain of the case valued. On the basis of their morphology, they seem to be cells with neurogenic capacity, which suggests an attempt to repair the damage. Nevertheless, further studies are needed to confirm it.

In addition, two glial alterations have been described for the first time in prion diseases. In relation to astrocytes, a peculiar type of the frontal cortex called interlaminar glia shows several morphological alterations that had been only described in Alzheimer's disease. In relation to microglia, a specific type known 'dystrophic', appears in the frontal cortex of patients affected by this group of diseases, when it had only been observed in healthy elderly people.

4 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Las enfermedades priónicas

4.1.1 Generalidades

Las enfermedades priónicas, prionopatías o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, con largos periodos de incubación, siempre con desenlace fatal. Afectan tanto a la especie humana como a ciertas especies animales, siendo en algunos casos potencialmente zoonóticas.

En relación con las EET animales, ya en la literatura del siglo XIX se encuentran descripciones de la enfermedad de Scrapie. Esta patología afecta a las especies ovina y caprina de forma endémica en la actualidad y constituye el prototipo de enfermedades priónicas, utilizándose como modelo para su estudio (Schneider et al., 2008). Actualmente también se conocen las siguientes EET descritas en animales. La encefalopatía espongiforme bovina (EEB; Hope et al., 1989), cuya relevancia aumentó al demostrarse su relación con la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ; Will et al., 1996); la enfermedad caquetizante del ciervo (Williams & Young, 1980), la encefalopatía de ungulados exóticos (Kirkwood & Cunningham, 1994), la encefalopatía espongiforme felina (Aldhous, 1990), la encefalopatía transmisible del visón (Hartsough & Burger, 1965), la encefalopatía espongiforme transmisible en primates no humanos (Bons et al., 1996) y muy recientemente descrita, la encefalopatía espongiforme en dromedarios, conocida como la enfermedad priónica de camélidos (Babelhadj et al., 2018; Tabla 1.)

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1.- Encefalopatías espongiformes transmisibles animales (Imran & Mahmood, 2011; Ironside et al., 2017; Babelhadj et al., 2018).

Enfermedades priónicas animales	Especies afectadas	Etiología
Scrapie	Oveja, cabra	Adquirida
Scrapie atípico o Nor98	Oveja, cabra	Idiopática
Encefalopatía espongiforme bovina clásica (EEB)	Vaca	Adquirida
Encefalopatía espongiforme bovina atípica (EEB) tipo H y L	Vaca	Idiopática
Enfermedad caquetizante del ciervo	Ciervo, reno, alce	Adquirida
Encefalopatía espongiforme felina	Gato, felinos salvajes	Adquirida
Encefalopatía transmisible del visón	Visón	Adquirida ¿?
Encefalopatía espongiforme de animales exóticos	Nyala, antílope, bisonte	Adquirida
Encefalopatía espongiforme transmisible en primates no humanos	Lemur y macaco	Adquirida
Enfermedad priónica del camello	Dromedario	Desconocida Probablemente adquirida

A principios del siglo XX se describió en Alemania la primera enfermedad priónica humana conocida, denominándose enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (Creutzfeldt, 1920; Jakob, 1921 a y b). Más tarde, se identificó el síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS), que afectaba a una familia austriaca (Gerstmann, 1936). Posteriormente, en una región de Papua-Nueva Guinea, se descubrió el Kuru, enfermedad que posteriormente fue relacionada con rituales de canibalismo que se practicaban en las tribus afectadas (Gajdusek & Zigas, 1957). A este grupo de enfermedades también pertenece el insomnio familiar fatal (IFF; Manetto et al., 1992) y el insomnio esporádico fatal (IEF; Mastrianni et al., 1999). Se conoce también la angiopatía cerebral amiloide causada por priones provocada por mutaciones en el gen que codifica para la PrP^{Sc} (PrP-AAC; Ghetti et al., 1996). Y por último, la proteinopatía más recientemente descrita es la denominada la proteinopatía variablemente sensible a la proteasa (PVSP; Gambetti et al., 2008).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 2.-Enfermedades priónicas humanas(Head, 2013; Ironside et al., 2017).

Enfermedades priónicas humanas	Etiología más probable
Kuru	Adquirida
Variante de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)	Adquirida
Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (iECJ)	Adquirida
Creutzfeldt-Jakob genético (gECJ)	Genética
Síndrome de Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Genética
Insomnio Familiar Fatal (IFF)	Genética
Angiopatía cerebral amiloide causada por Priones (PrP-CAA)	Genética
Creutzfeldt-Jakob esporádico (eECJ)	Idiopática
Insomnio esporádico fatal (IEF)	Idiopática
Prionopatía variablemente sensible a la proteasa (PVSP)	Idiopática

Así, la etiología de las enfermedades priónicas se clasifican en tres tipos:

- Adquirida: Se produce debido a la infección por un agente causal.
- Genética: Asociada a mutaciones en el gen que codifica la proteína prión (*PRNP*).
- Esporádica o idiopática: Se presenta en individuos en los que se han descartado las otras dos posibles etiologías.

4.1.2 El agente etiológico

Durante el siglo XX se propusieron varias hipótesis sobre la etiología del agente causal de este grupo de enfermedades hasta ese momento desconocida. Pero no fue hasta 1982, cuando Prusiner propuso una hipótesis revolucionaria que contradecía el dogma central de la biología molecular (Crick, 1970), denominada actualmente como la hipótesis del prión. La hipótesis más aceptada actualmente es la que postula que el agente causal de este grupo de enfermedades es una proteína carente de material genético con capacidad autorreplicativa denominada prión (*proteinaceous infectious particle*; Prusiner, 1982).

La proteína prión patológica oPrP^{Sc} es una isoforma de una proteína celular oPrP^C, que está situada en la región extracelular de la membrana, ligada al glicosilfosfatidilinositol. Es ubicada en todas las células del organismo de mamíferos (Moore et al., 2009; Ironside, 2014), siendo

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

abundante encélulas del sistema nervioso central (SNC), tanto en las neuronas como en la neuroglía. Aunque no están totalmente determinadas, se le asocian una serie de funciones como la adhesión celular, señalización, diferenciación celular, mantenimiento de la mielinización y del ritmo circadiano, homeostasis de iones metálicos, participación en la homeostasis mitocondrial y en la neuroprotección. Utilizando modelos de otras patologías como la enfermedad de Alzheimer (EA), también se ha demostrado un papel protector frente a procesos de estrés celular y la neurodegeneración mediante la regulación de los niveles de proteína tau y β -amiloide ($A\beta$; Castle & Gill, 2017; Linden, 2017; Mabbott, 2017).

Desde el punto de vista bioquímico, el origen de este grupo de enfermedades se basa en un cambio conformacional de la estructura terciaria de la PrP^C , rica en α -hélice, que se transforma en una isoforma aberrante en β -lámina (PrP^{Sc}), disminuyendo su solubilidad y aumentando su resistencia a las proteasas. Existen una serie de co-factores que parecen intervenir en este proceso, siendo ARN, glicosaminoglicanos y lípidos firmes candidatos. Se piensa que esta conversión se produce en la superficie celular o a través de la vía endocítica (Ironsides, 2014; Mabbott, 2017). Lo que no está claro es si se produce por pérdida de funcionalidad fisiológica o por ganancia de capacidad neurotóxica, ya que hay pocas evidencias de que PrP^{Sc} sea tóxica por sí misma. También se ha propuesto la existencia de productos intermedios como causantes de la toxicidad en relación con este cambio conformacional (Ironsides, 2014). La presencia de PrP^C es necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Bueler et al., 1993) y para la replicación de la proteína (Prusiner et al., 1993; Manson et al., 1994), que es capaz de autorreplicarse mediante el reclutamiento de PrP^C para transformarse en PrP^{Sc} (Prusiner, 1982).

4.1.3 Bases moleculares de las enfermedades priónicas humanas

Para entender mejor estas enfermedades, hay que definir el fenómeno biológico de cepa. Durante años se ha considerado exclusivo de este grupo de enfermedades, pero actualmente se está trasladando a otras enfermedades neurodegenerativas (Jucker & Walker, 2018). Se define como un aislado animal o humano que después de haber sido inoculado en un hospedador provoca una enfermedad con unas características distintivas como el periodo de incubación, patrón de distribución de PrP^{Sc} y severidad de cambios neuropatológicos en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

diferentes áreas del SNC. Se piensa que esta diversidad biológica está asociada a diferentes conformaciones de la PrP^{Sc} (Zerr & Parchi, 2018).

La técnica de *Western-blot* (WB) es clave para comprender la diversidad de cepas o tipos dentro de este grupo de enfermedades. Los patrones obtenidos mediante esta técnica junto con los polimorfismos del codón 129 son la base para la clasificación de las enfermedades priónicas humanas. A través de ella se determinan diferentes perfiles de glicosilación, ya que la PrP^{Sc} es parcialmente resistente a las proteasas. Sometiendo el tejido a tratamiento con proteinasa K se consigue la digestión completa de la PrP^C y una digestión parcial de la PrP^{Sc}, que dará lugar a un fragmento N-terminal resistente a la proteasa. Este fragmento presenta diferentes estados de glicosilación debido a su estructura, pudiendo diferenciarse entre tres formas: monoglicosilada, diglicosilada o sin glicosilar. Cada uno se corresponderá con las diferentes bandas de WB según su peso molecular. A su vez estas bandas difieren en su movilidad electroforética, dando lugar a los patrones de bandas que corresponden a diferentes tipos de PrP^{Sc}, probablemente porque reflejen diferentes conformaciones de la proteína.

Por otro lado, independientemente de la etiología de la enfermedad priónica, existe una influencia genética debido a diferentes polimorfismos del gen que tienen una influencia a varios niveles, desde el fenotipo clínico, la predisposición o resistencia, hasta la duración de la enfermedad. En la ECJ el polimorfismo más importante se localiza en el codón 129, que codifica para 2 aminoácidos metionina (M) o valina (V). Según los pacientes presenten heterocigosis (MV) u homocigosis (MM, VV), las características de los diferentes tipos de ECJ se ven altamente influenciadas (Palmer et al., 1991; Pocchiari et al., 2004; Capellari et al., 2011).

Parchi and Gambetti ^a			Collinge ^b		
Subtype	Onset (Years)	Duration (Months)	Subtype	Onset (Years)	Duration (Months)
MM1 ^c	42-91	1-18	IMM Short duration	56-79	1-5
MV1 ^c	51-72	2.5-9	2 MM Long Duration	52-78	1-17
VV1	24-49	14-16	2MV	54-79	2-9
MM2	49-77	9-36	2VV	41-79	5-9
MV2	40-81	5-72	Not reported	—	—
VV2	41-80	3-18	3MV	61-77	7-21
			3VV	46-62	2-11

Immunoblot profile ^d		Immunoblot profile ^d		
Type 1	Type 2	Type 1	Type 2	Type 3
~21 kDa ^e	~19 kDa ^e	Relative molecular mass not reported		

^aParchi et al., (1996, 1999); ^bHill et al., 2003; ^cShare the same disease phenotype; ^dRefers to the PK-resistant PrP^{Sc} fragments; ^eRefers to relative molecular mass of the unglycosylated PrP^{Sc} fragment (black bars).

Figura 1.- Clasificación de los tipos de eECJ y su relación con las diferentes clasificaciones de PrP^{Sc} según sus patrones de glicosilación y polimorfismos del codón 129 (Cali et al., 2006).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Cuando el grupo de Parchi y Gambetti clasificó los distintos subtipos de eECJ en base a la técnica molecular de WB y el genotipo que presentaba el paciente (Figura 1) distinguió originalmente 2 tipos de PrP^{Sc}: tipo 1 (21 kDa) y tipo 2 (19 kDa), haciendo referencia al nombrar estos tipos de PrP^{Sc} el peso molecular de la banda no glicosilada (Parchi et al., 1996; Parchi et al., 1999). Posteriormente el grupo de Collinge realizó un experimento análogo en el que determinaba que había 3 tipos de PrP^{Sc} en cuanto a su movilidad en gel (Collinge et al., 1996; Wadsworth et al., 1999; Hill et al., 2003). Para el grupo de Collinge sus tipos 2 y 3 se correspondían respectivamente con el tipo 1 y 2 según la clasificación de Parchi y Gambetti e identificaba un tipo 1 que parecía estar ~0,5 kDa por encima del tipo 1 de Parchi y Gambetti. Es decir, el subtipo conocido actualmente como eECJ MM1 identificado por Parchi y Gambetti es heterogéneo, incluyendo 2 isoformas de PrP^{Sc} con 2 fenotipos diferenciados. Lo que este hallazgo básicamente demostraba es que estas diferencias mediante WB pueden ser debidas a variaciones en las condiciones experimentales (Wadsworth et al., 1999; Zanusso et al., 2001; Notari et al., 2004).

Con la aparición de la vECJ, se distingue claramente un nuevo tipo de PrP^{Sc} denominado tipo 4 (Hill et al., 2003) que destaca por su predominancia de la banda diglicosilada además de tener un fragmento proteolítico de distinto tamaño llamada tipo 2B, según describe el grupo de Parchi y Gambetti (Parchi et al., 1997). El tipo 5 corresponde a un patrón de bandas no visto en muestras humanas, solamente observado en ratones transgénicos VV para el codón 129 inoculados con vCJD (Hill et al., 1997). Y un tipo 6 sólo descrito en una muestra de eECJ MM con un patrón de bandas exclusivo (Hill et al., 2003). La relación entre estas 2 clasificaciones de PrP^{Sc} se ilustra en la Figura 2.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

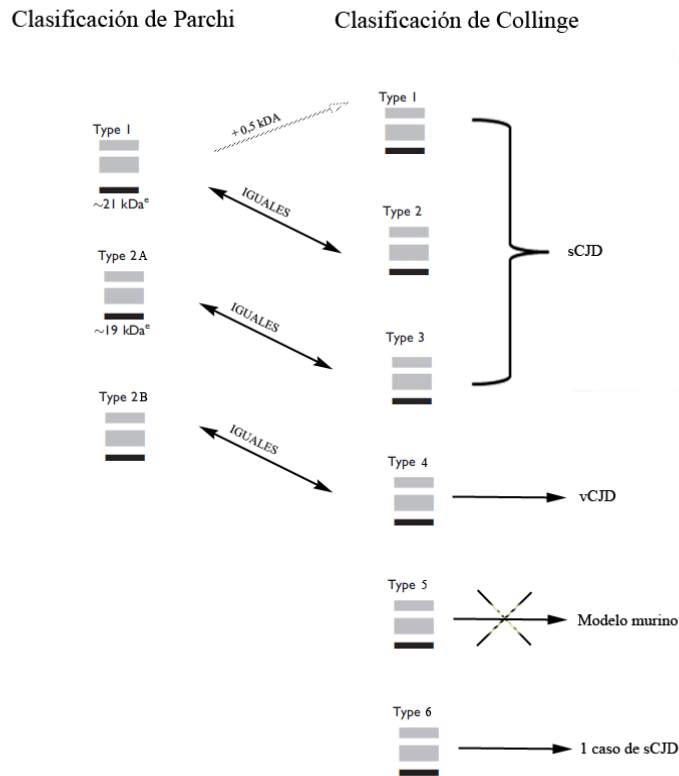


Figura 2.-Relación entre las clasificaciones de los tipos de PrP^{Sc} asociados a EC establecidas por los grupos de Parchi y Collinge. Basado en Hill et al., 2003 y Cali et al., 2006.

Paralelamente han ido apareciendo nuevos tipos de PrP^{Sc}, demostrando que los patrones obtenidos no son tan exclusivos como se pensaba. Los mismos patrones asociados a los tipos 1 y 2A de eECJ también se han detectado en la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iECJ). También se ha detectado en algunos casos de iECJ asociado a trasplante de duramadre (dECJ) un tipo denominado iPrP^{Sc} o tipo intermedio inusual (20kDa; Kretzschmar et al., 2003; Kobayashi et al., 2007).

Con la aparición de la PVSP_{Prse} descubrió un tipo de PrP^{Sc} con características radicalmente diferentes a lo visto hasta ese momento (Gambetti et al., 2008; Zou et al., 2010; Puoti et al., 2012). Mediante el análisis por WB se identificaron 2 patrones de bandas en función del anticuerpo utilizado: si reconocía específicamente el fragmento N-terminal de la PrP^{Sc}, el patrón de bandas comprendía 5 fragmentos (Zou et al., 2010); si el anticuerpo era específico frente al extremo C-terminal aparecía un perfil con 7 bandas. La relación de bandas características de PVSP_{Prse} eECJ usando como modelo el subtipo VV2 se ilustra en la Figura 3.

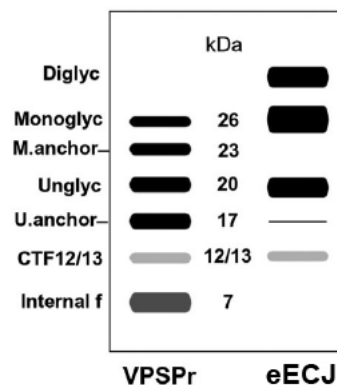


Figura 3.-Patrones de glicosilación obtenidos para PVSPry eECJ. Las bandas en negro representan los fragmentos detectados por anticuerpos frente a N-terminal; en gris, el fragmento reconocido por anticuerpos frente a C-terminal. La banda *Internal f* (gris oscuro) representa 2 fragmentos diferentes concomitantes de 7kDa para anticuerpos diferentes frente a N-terminal y C-terminal. Modificado de Notari et al., 2018.

Para comprender mejor las bases moleculares de este grupo de enfermedades y su clasificación es necesario conocer el fenómeno de la concurrencia, descrito en el marco de la eECJ (Parchi et al., 2009), que consiste en que en un mismo individuo coexisten varios tipos de PrP^{Sc}.

4.1.4 Diagnóstico de las enfermedades priónicas humanas

El programa de vigilancia y diagnóstico de las enfermedades priónicas en España se lleva a cabo a través del Centro Nacional de Epidemiología del Instituto Carlos III de acuerdo con las recomendaciones del grupo europeo de vigilancia de las enfermedades priónicas humanas situado en Edinburgo. Existe un registro a nivel nacional de este grupo de enfermedades con el objetivo de establecer un perfil clínico-epidemiológico, identificar nuevos casos de iECJ y vECJ e identificar factores de riesgo (Instituto de Salud Carlos III, 2019).

Los casos son diagnosticados por sospecha clínica en un medio hospitalario por un neurólogo, generalmente. A continuación, se llevan a cabo una serie de pruebas complementarias que se describen más adelante en esta revisión. Para un diagnóstico definitivo fiable, es necesario realizar un diagnóstico anatomopatológico de tejido del SNC extraído por autopsia. Existe la posibilidad de realizar una biopsia cerebral *ante mortem*, pero al tratarse de un procedimiento que conlleva un alto riesgo para el paciente, sólo se realiza en aquellos casos que se requiera descartar otra patología curable (Cano et al., 2015). Una vez confirmado, a través de una red de médicos y coordinadores epidemiológicos, se declara el caso que será incorporado en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

unregistro nacional de la enfermedad localizado en el Centro Nacional de Epidemiología que a su vez, lo transmite a la red de vigilancia epidemiológica a nivel europeo (EUROCID, 2019).

4.1.4.1 Criterios de clasificación para el diagnóstico

La definición de un caso de enfermedad priónica (en función de los distintos grados de certeza: posible, probable o definitivo) se determina en base a la aplicación de unos criterios diagnósticos establecidos de acuerdo con las recomendaciones del grupo europeo para la vigilancia de EET humanas (*National CJD Research & Surveillance Unit, NCJDRSU, 2019; Figura 4*).

1. SPORADIC CJD (from January 2017)

1.1 DEFINITE:

Progressive neurological syndrome AND
Neuropathologically or immunocytochemically
or biochemically confirmed

1.2 PROBABLE:

1.2.1 I + 2 of II and III

OR

1.2.2 I + 2 of II and IV

OR

1.2.3 I + 2 of II and positive 14-3-3

OR

1.2.4 Progressive neurological syndrome and
positive RT-QuIC in CSF or other tissues

1.3 POSSIBLE:

I + 2 of II + duration < 2 years

- | | |
|-----|--|
| I | Rapidly progressive cognitive impairment |
| II | A Myoclonus
B Visual or cerebellar problems
C Pyramidal or extrapyramidal features
D <u>Akinetic mutism</u> |
| III | Typical EEG (generalised periodic complexes) |
| IV | High signal in caudate/putamen on MRI brain scan or at least two cortical regions (temporal, parietal, occipital) either on DWI or FLAIR |

2. ACCIDENTALLY TRANSMITTED TSE

2.1 DEFINITE

Definite CJD with a recognised iatrogenic risk factor (see box)

2.2 PROBABLE

2.2.1 Progressive predominant cerebellar syndrome in human pituitary hormone recipients

2.2.2 Probable CJD with recognised iatrogenic risk factor (see box)

2.3 POSSIBLE

Possible CJD with a recognised risk factor (agreed and EURO meeting Bled, 2006)

RELEVANT EXPOSURE RISKS FOR THE CLASSIFICATION AS IATROGENIC CJD

The relevance of any exposure to disease causation must take into account the timing of the exposure in relation to disease onset

- Treatment with human pituitary growth hormone, human pituitary gonadotrophin or human dura mater graft.
- Corneal graft in which the corneal donor has been classified as definite or probable human prion disease.
- Exposure to neurosurgical instruments previously used in a case of definite or probable human prion disease.

This list is provisional as previously unrecognised mechanisms of human prion disease may occur

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

3. GENETIC TSE

3.1 DEFINITE

- 3.1.1 Definite TSE + definite or probable TSE in 1st degree relative
- 3.1.2 Definite TSE with a pathogenic PRNP mutation (see box)

3.2 PROBABLE

- 3.2.1 Progressive neuropsychiatric disorder + definite or probable TSE in 1st degree relative
- 3.2.2 Progressive neuropsychiatric disorder + pathogenic PRNP mutation (see box)

•PRNP MUTATIONS ASSOCIATED WITH GSS NEUROPATHOLOGICAL PHENOTYPE
P102L, P105L, A117V, G131V, F198S, D202N, Q212P, Q217R, M232T, 192 bpi

•PRNP MUTATIONS ASSOCIATED WITH CJD NEUROPATHOLOGICAL PHENOTYPE
D178N-129V, V180I, V180I-M232R, T183A, T188A, E196K, E200K, V203I, R208H, V210I, E211Q, M232R, 96 bpi, 120 bpi, 144 bpi, 168 bpi, 48 bpi^{del}

•PRNP MUTATIONS ASSOCIATED WITH FFI NEUROPATHOLOGICAL PHENOTYPE D178N-129M

•PRNP MUTATION ASSOCIATED WITH VASCULAR PRP AMYLOID Y145s

•PRNP MUTATIONS ASSOCIATED WITH PROVEN BUT UNCLASSIFIED PRION DISEASE H187R, 216 bpi,

•MUTATIONS ASSOCIATED WITH NEURO-PSYCHIATRIC DISORDER BUT NOT PROVEN PRION DISEASE I138M, G142S, Q160S, T188K, M232R, 24 bpi, 48 bpi, 48 bpi + nucleotide substitution in other octapeptides

(additional list of mutations appended)

4. vCJD

4.1 DEFINITE

1A and neuropathological confirmation of vCJD^e.

4.2 PROBABLE

- 4.2.1 I and 4/5 of II and IIIA and IIIB
- 4.2.2 I and IV A^d

4.3 POSSIBLE

I and 4/5 of II and III A

I A Progressive neuropsychiatric disorder
B Duration of illness > 6 months
C Routine investigations do not suggest an alternative diagnosis
D No history of potential iatrogenic exposure
E No evidence of a familial form of TSE

II A Early psychiatric symptoms^a
B Persistent painful sensory symptoms^b
C Ataxia
D Myoclonus or chorea or dystonia
E Dementia

III A EEG does not show the typical appearance of sporadic CJD^c in the early stages of illness
B Bilateral pulvinar high signal on MRI scan

IV A Positive tonsil biopsy^d

a depression, anxiety, apathy, withdrawal, delusions.
b this includes both frank pain and/or dysaesthesia.
c the typical appearance of the EEG in sporadic CJD consists of generalised triphasic periodic complexes at approximately one per second. These may occasionally be seen in the late stages of variant CJD.
d tonsil biopsy is not recommended routinely, nor in cases with EEG appearances typical of sporadic CJD, but may be useful in suspect cases in which the clinical features are compatible with vCJD and MRI does not show bilateral pulvinar high signal.
e spongiform change and extensive PrP deposition with florid plaques throughout the cerebrum and cerebellum.

Figura 4.- Criterios diagnósticos para los diferentes tipos de ECJ1) eECJ 2) iECJ 3) gECJ 4) vECJ (National CJD Research & Surveillance Unit, NCJDRSU, 2019)

Los criterios diagnósticos se elaboran a partir de la información clínica (sospecha), epidemiológica y de laboratorio (pruebas complementarias). Éstas últimas se detallan en la continuación.

4.1.4.2 Criterio de laboratorio o pruebas complementarias

Hay que tener en cuenta que, como la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, las enfermedades priónicas no son uniformes, apareciendo muchas veces casos atípicos. Además, no siempre se diagnostica al paciente en el mismo momento de la enfermedad (Cano et al., 2015).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1.4.2.1 Estudio genético

Resulta esencial ya que, como se ha explicado anteriormente, se han descrito diversas mutaciones del gen *PRNP* que han sido asociadas a la enfermedad, así como diferentes polimorfismos del codón 129 que influyen en la susceptibilidad a los diferentes tipos de ECJ (Cano et al., 2015; Ironside et al., 2017; Zerr & Parchi, 2018).

4.1.4.2.2 Análisis de la proteína 14-3-3 en el líquido cefalorraquídeo (LCR)

La proteína 14-3-3 es un marcador del daño neuronal, puesto que aunque se expresa de forma normal en el tejido neuronal, su presencia en el LCR aumenta en los casos de ECJ.

A pesar de constituir uno de los principales biomarcadores utilizados en el diagnóstico de las enfermedades priónicas no es suficientemente específico puesto que también se observa un incremento en otras patologías cerebrales. Además, los resultados varían entre pacientes y posee una sensibilidad y especificidad dependiente del tipo de ECJ así como de su fase de desarrollo.

En los últimos años, otras proteínas como S100B o tau fosforilada también han sido incluidas como posibles biomarcadores. Aunque su análisis no está todavía estandarizado, pueden ayudar a establecer un diagnóstico final (Cano et al., 2015; Ironside et al., 2017; Zerr & Parchi, 2018).

4.1.4.2.3 Detección de la PrP^{Sc} en LCR

Recientemente se ha incluido la detección de la PrP^{Sc} en el LCR como criterio diagnóstico, pero la técnica utilizada para ello, el test de conversión inducida de la PrP^{Sc} en tiempo real (*real-time quaking-induced conversion, RT QuIC*), no está disponible actualmente en los laboratorios nacionales (Wilham et al., 2010).

4.1.4.2.4 Electroencefalograma (EEG)

Se trata de una herramienta diagnóstica al representar la actividad bioeléctrica del SNC (Figura 5). Apoya el diagnóstico clínico, al observarse complejos periodos de ondas agudas bi- o

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

trifásicas de forma variable entre las diferentes enfermedades priónicas. Ayuda para clasificar el diagnóstico como “probable”, pero tiene sus deficiencias ya que la mayoría de las veces no se detecta al inicio de la enfermedad sino que se detecta pasados unos 2 a 3 meses desde su inicio. Además, presenta una baja especificidad ya que puede ofrecer falsos-positivos con frecuencia, en casos como encefalitis, diferentes encefalopatías, intoxicación por litio, linfoma intracerebral u otras enfermedades neurodegenerativas que deben ser incluidas en el diagnóstico diferencial. Para la interpretación de esta técnica deben tenerse en cuenta los criterios de Steinhoff y Knight, establecidos por la OMS (Cano et al., 2015; Ironside et al., 2017; Zerr & Parchi, 2018).

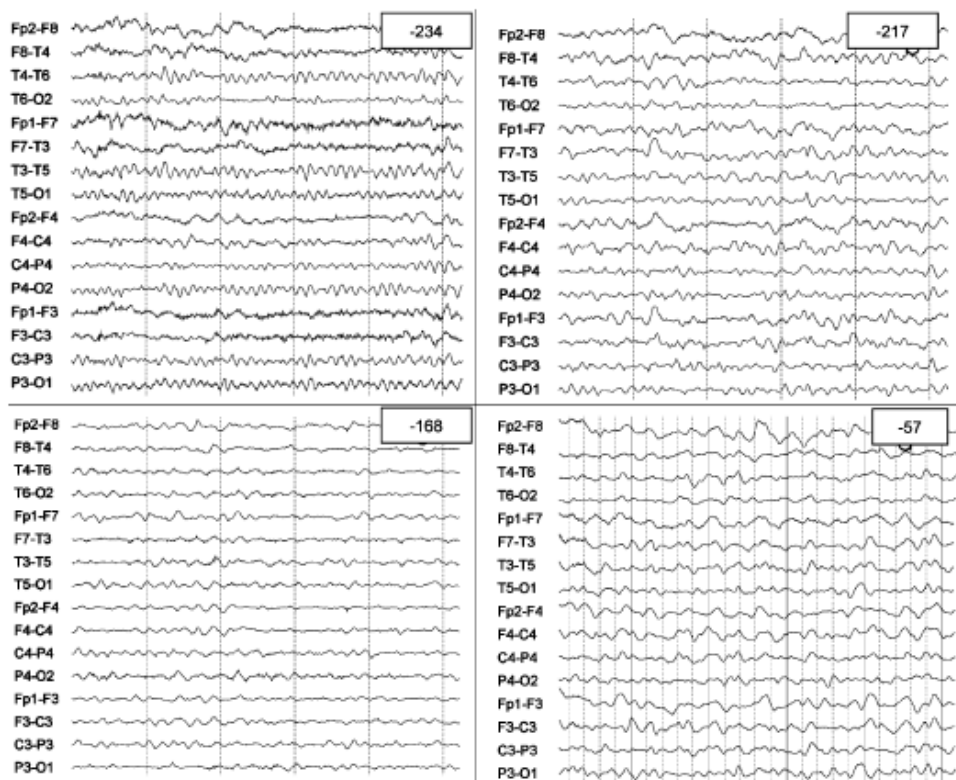


Figura 5.-EEG de paciente de eECJ subtipo MV1. Grabaciones documentadas desde 234 hasta 57 días antes de la muerte (Wieser et al., 2004).

4.1.4.2.5 Imagen o tomografía por resonancia magnética nuclear (RMN)

La imagen por RMN presenta mucha mayor precisión que el EEG. Con ella se pueden realizar diferentes análisis como las denominadas T1, T2, FLAIR y principalmente DWI en la corteza cerebral, que permiten estimar el estado del SNC. Además de detectar la enfermedad en estados iniciales, muestran una hiperintensidad que refleja el cambio esponjiforme en la eECJ. Los perfiles de RMN y su evolución durante el desarrollo de la enfermedad reflejan los

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

diferentes perfiles neuropatológicos de los diferentes tipos de enfermedades priónicas, incluso de los subtipos de vECJ (Cano et al., 2015; Ironside et al., 2017; Zerr & Parchi, 2018).

En el 90% de los casos de vECJ (Zeidler et al., 2000) se detecta una afectación del tálamo posterior, conocido como “signo del pulvinar” (Figura 6). También se observa una alta intensidad en los ganglios basales y la corteza cerebral (Brandel & Knight, 2018). Otro signo detectable en este tipo es el “signo del palo de hockey”, que consiste en el signo del pulvinar combinado con un aumento de señal en el núcleo dorsomedial del tálamo, apareciendo aproximadamente en el 50% de los casos. Estos signos ayudan a orientarse hacia un diagnóstico definitivo, pero no son concluyentes puesto que pueden aparecer en otras enfermedades priónicas. Por otro lado, en un caso de vECJ se ha descrito el “signo de la cruz”, que consiste en una hiperintensidad pontina característico de una atrofia multisistémica (Ortega-Cubero et al., 2013).

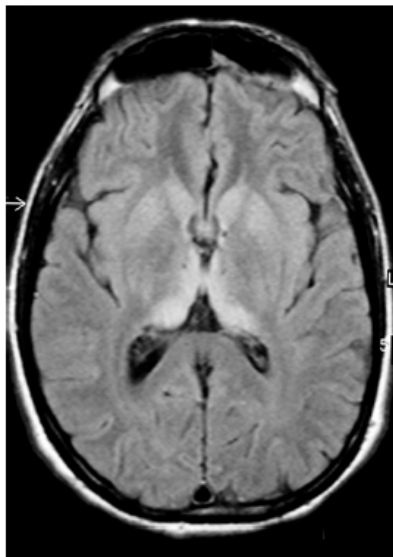


Figura 6.- RMN mostrando el “signo del pulvinar” en un caso de vECJ, en el que se observa una hiperintensidad del núcleo caudado y putamen, pero una intensidad mucho mayor en la región talámica posterior (Brandel & Knight, 2018).

4.1.4.2.6 Estudio anatomopatológico

Es el único método que permite establecer el diagnóstico definitivo de las enfermedades priónicas humanas.

Macroscópicamente, el encéfalo de pacientes afectados por enfermedades priónicas es similar al de pacientes de edad anciana, excepto en los casos donde se observa atrofia, que resulta directamente proporcional a la duración de la enfermedad. Este hallazgo se ha

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

observado principalmente en casos de ECJpanencefálico afectando al cerebro y cerebelo, y en algunos casos de eECJ, vECJ, iCJD o GSS, pero solamente a nivel cerebelar(Ironside et al., 2017).

Microscópicamente, las lesiones características asociadas a las enfermedades priónicas son el cambio espongiiforme, gliosis reactiva, muerte neuronal, acumulación de PrP^{Sc} y formación de placas amiloides(Ironside, 2014). Estas características son muy variables, tanto en intensidad como en distribución, no sólo entre las diferentes formas de ECJ sino también entre individuos(Ironside et al., 2017).

El cambio espongiiforme se debe a la vacuolización localizada esencialmente en la sustancia gris, aunque también puede aparecer en la sustancia blanca, que no debe confundirse nunca con artefactos asociados a la retracción del tejido o al edema cerebral. Hay que tener en cuenta que la vacuolización de la sustancia gris también aparece en otras encefalopatías metabólicas y síndromes tóxicos(Ironside et al., 2017). Aunque se considera una característica exclusiva de este grupo de enfermedades, se ha descrito el cambio espongiiforme en casos de demencia con cuerpos de Lewy, EA(Smith et al., 1987; Sherzai et al., 2013) o esclerosis lateral amiotrófica (ELA; Saberi et al., 2015). Las vacuolas tienen un tamaño aproximado de 2 a 20µm de diámetro, y a veces pueden mostrarse de forma confluyente(Ironside et al., 2017).

El diagnóstico neuropatológico definitivo de una enfermedad priónica exige la realización de técnicas moleculares o de inmunohistoquímica (IHQ) para la detección de PrP^{Sc} en el tejido. En concreto, los patrones inmunohistoquímicos son una herramienta utilizada no sólo en el diagnóstico, sino también en la clasificación de las enfermedades priónicas.

En estas enfermedades aparecen placas amiloides mayoritariamente compuestas por PrP^{Sc}, que presentan diferentes morfologías visualizables mediante técnicas como la H/E, tinciones amiloides o IHQ para la detección de PrP^{Sc}. Según la bibliografía (Ironside et al., 2017) se clasifican los siguientes tipos:

- Placas tipo Kuru: constan de un núcleo denso que irradia fibras periféricas. Originariamente fue descrito en casos de Kuru(Fowler & Robertson, 1959; Klatzo et al., 1959; Sikorska et al., 2009), pero también se ha observado en el subtipo MV2 de eECJ (Parchi et al., 1999) y de iECJ asociados a hormona de crecimiento (Billette de Villemeur & Pradel, 1994; Cali et al., 2015).

- Placas multicéntricas: consisten en placas grandes e irregulares. Este hallazgo es una característica de GSS asociado a diferentes mutaciones del gen *PRNP*(Gerstmann, 1936; Ironside et al., 2017; Ghetti et al., 2018).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Placas floridas: consisten en un núcleo amiloide eosinofílico del cual irradian fibras periféricas que a su vez están rodeadas de vacuolas o cambio esponjiforme. Este hallazgo es considerado como criterio diagnóstico de vECJ (Ironsides et al., 2017; Brandel & Knight, 2018). Muy parecidas a las placas tipo kuru (Brandel & Knight, 2018), también han sido detectadas en casos de dECJ (Shimizu et al., 1999; Kobayashi et al., 2018). Paradójicamente, fueron descritas por primera vez en un experimento en modelo murino *wild-type* inoculado con 3 cepas de Scrapie (Fraser, 1979).

- Microplacas: son características de PVSP_r, su localización principal es el córtex cerebelar y raramente aparecen en el hipocampo. Tienen una forma irregular y pueden presentarse fusionadas (Gambetti et al., 2008; Zou et al., 2010). A nivel ultraestructural se observan unas estructuras débilmente definidas con un *cluster* de fibras en una matriz amorfo-granular, interpretada como placas amiloideas inmaduras (Gambetti et al., 2008).

En el caso específico de la vECJ existe una prueba diagnóstica *in vivo* complementaria que consiste en la detección de laPrP^{Sc} en una biopsia de tonsila. Esta asociación con el sistema linforreticular es una característica patogénica exclusiva de este tipo de ECJ, de manera que un resultado positivo en un contexto determinado puede definir un caso como positivo definitivo. Aún así, no se suele utilizar porque su sensibilidad no alcanza el 100% (Brandel & Knight, 2018).

4.1.4.3 Criterio epidemiológico

Esencialmente útil en el caso de vECJ e iECJ.

-Para el vECJ: cuando el historial del paciente sugiere una posible transmisión por exposición a tejidos a partir de un caso confirmado. Por una transfusión sanguínea, por ejemplo.

-Para el iECJ: cuando existe posibilidad de exposición a los tratamientos iatrogénicos detallados en el apartado siguiente a instrumentos neuroquirúrgicos utilizados en pacientes afectados por una enfermedad priónica confirmada o probable (Cano et al., 2015).

4.1.4.4 Técnicas de diagnóstico auxiliares para la detección de priones

Estas técnicas se utilizan por la experiencia en investigación, pero no están oficialmente reconocidas por la Unión Europea para el diagnóstico de la enfermedad (Ironsides et al., 2017).

- La transmisión experimental *in vivo*, que consiste en inocular un extracto de tejido infectado en animales. Principalmente realizada en modelos murinos *wild-type* o transgénicos (para sobre-expresar el gen *PRNP* humano), permite detectar la infectividad de una muestra inoculada. Es considerada la técnica más sensible y resulta básica para diferenciar cepas priónicas. Pero no se usa con frecuencia debido a su alto coste de tiempo y recursos.

- Inmunoensayos basados en la conformación de la PrP^{Sc}. La mayoría de estas técnicas están basadas en la resistencia de la PrP^{Sc} a la proteasa o/y su agregación *in vivo*. Estas técnicas están basadas en un método alternativo para detectar las diferencias conformacionales entre la PrP^{Sc} y PrP^C, pero no están estandarizadas como métodos de diagnóstico (Safar et al., 2005).

- La amplificación cíclica de proteína mal plegada (*protein misfolding cyclic amplification*, PMCA) es una técnica *in vitro* que detecta niveles muy bajos de PrP^{Sc} en una muestra de tejido incrementando los niveles de ésta para su posterior detección y caracterización por otras técnicas. Esta técnica consiste en amplificar una pequeña cantidad de PrP^{Sc} que actúa como molde o núcleo de crecimiento en un medio saturado de PrP^C que actúa de sustrato, simulando *in vitro* la replicación de priones *in vivo* (Saborio et al., 2001). Algunos estudios apoyan que esta técnica permite ampliar la cantidad de PrP^{Sc} hasta lograr detectar PrP^{Sc} en fluidos como la sangre y orina de vECJ (Moda et al., 2014; Concha-Marambio et al., 2016).

- La *RT-QuIC* (Wilham et al., 2010) es una técnica *in vitro* basada en la PMCA en la que se sustituye el sustrato por una PrP recombinante. Los estudios realizados apoyan que tiene una mayor sensibilidad que la PMCA, incluso algunos de ellos han detectado PrP^{Sc} en hisopos nasales de pacientes con eECJ mediante esta técnica (Zanusso et al. 2016).

4.1.5 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob

Descubierta en 1920 por los dos investigadores alemanes anteriormente citados, es una enfermedad rara que aparece en 1 ó 2 casos por millón de habitantes al año, siendo la mayoría

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

de ellos (85 %) de origen esporádico. Los casos de origen genético y adquirido constituyen el 10% y 5%, respectivamente.

A continuación se detallan los distintos tipos en función del origen del agente etiológico (Head & Ironside, 2012).

4.1.5.1 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (eECJ)

Es la forma más común de ECJ a pesar de ser una enfermedad rara que afecta a 2 personas por millón por año (Minikel et al., 2016) y se distribuye mundialmente de forma aleatoria (Cousens et al., 1997). No se conoce su origen, es decir, es una forma idiopática de enfermedad priónica en la que no hay evidencias que la asocien con una fuente ambiental infecciosa. Se piensa que muchos de estos casos son causados por mutaciones somáticas o debidos a un cambio estocástico en la estructura de la PrP^{Sc} (Head & Ironside, 2012; Zerr & Parchi, 2018).

Afecta principalmente a ancianos (Ladogana et al., 2005), aunque existe algún caso descrito en pacientes jóvenes (Will et al., 1998). La duración media de la enfermedad es corta, alrededor de unos 6 meses (Pocchiari et al., 2004), aunque hay casos de curso atípico (Brown et al., 1984; Zerr & Parchi, 2018). La media de duración de la enfermedad también puede variar entre los distintos subtipos de eECJ (Pocchiari et al., 2004).

La eECJ es una enfermedad muy heterogénea con un amplio espectro de formas fenotípicas asociadas a la edad de inicio, características, ratio de progresión y clínica. La clínica en los estadios iniciales o fase prodrómica se caracteriza por un cambio de comportamiento social, depresión, fobias, debilidad general (adinamia), cefaleas, mareos e incluso existen registros de casos de enfermos con problemas de sueño y trastornos alimenticios relacionados con la pérdida de peso. Los síntomas son muy variados e inespecíficos (Zerr & Parchi, 2018). Resulta difícil distinguir esta enfermedad de otras demencias en este estadio (Head & Ironside, 2012). Sus principales características clínicas neuropsiquiátricas son demencia progresiva, ataxia, signos visuales, mioclonías y anomalías en el tono muscular, apatía, disforia, trastornos alimenticios, agitación, alucinaciones, trastornos de sueño, ansiedad, problemas motrices, irritabilidad, desinhibición, euforia o delirios (Zerr & Parchi, 2018).

Conforme la enfermedad avanza los síntomas neurológicos aumentan: demencia, signos visuales, cerebelares, piramidales y extrapiramidales, mioclonía y mutismo acinético (Otto et al., 1998). Algunos pacientes muestran disartia, apraxia, alucinaciones y ataques epilépticos. En los últimos estadios de la enfermedad la clínica consiste en una postración completa en la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

que el paciente pierde el contacto total con el medio. La principal causa de la muerte es provocada por una neumonía por aspiración (Zerr & Parchi, 2018).

Antes del establecimiento de los 6 subtipos de eECJ que se indican en la Tabla 3 (recientemente se ha añadido un séptimo subtipo muy infrecuente), existía otra clasificación basada exclusivamente con su fenotipo clínico. La variante mioclónica o síndrome de Heidenhain correspondía al subtipo MM1/MV1, la variante atáxica/cerebelar correspondía al subtipo VV2, el síndrome de Brownell-Oppenheimer o también llamado variante atáxica correspondía al subtipo MV2. A este último subtipo algunos autores lo han denominado variante con placas Kuru debido a la presencia de placas características. El subtipo MM2T se denominaba antes de las clasificaciones moleculares tipo variante talámica (Parchi et al., 1999; Puoti et al., 2012; Sikorska et al., 2012). A continuación se resume la actual clasificación de eECJ en base a las diversas combinaciones de tipo de PrP^{Sc} (tipo 1 y tipo 2) y haplotipo del codón 129 (M o V) (Palmer et al., 1991; Parchi et al., 1996; Parchi, Giese, et al., 1999) con las características clínico-patológicas de cada una de ellas.

Tabla 3.-Características identificativas de los subtipos de eECJ (Zerr & Parchi, 2018).

	Molecular disease subtype	Median age at onset (range) (years)	Median duration (range) (months)	Most prominent clinical signs/symptoms	Distinctive histopathologic features
Frequent	MM1(V)1	68 (31–86)	4 (1–24)	Dementia, cortical anopsia, ataxia, myoclonus	Neocortex (especially in occipital lobe), striatum, thalamus, and cerebellum constantly affected “synaptic type” PrP staining
	MV2K	65 (36–83)	17 (4–48)	Ataxia, dementia, extrapyramidal	Similar to VV2 with more involvement of the cerebral cortex, amyloid kuru plaques in the cerebellum, plaque-like focal PrP deposits
	VV2	64 (40–83)	6.5 (3–18)	Prominent ataxia, late dementia	Prominent pathology in cerebellum and subcortical areas, late cortical involvement, plaque-like and perineuronal PrP staining
Rare	MM2T	52 (26–71)	16 (8–36)	Ataxia, diplopia, psychiatric signs, sleep loss, late cognitive impairment	Atrophy of the thalamus and inferior olive, focal spongiosis limited to the cerebral cortex
	MM2C	64 (49–77)	16 (9–36)	Progressive dementia for several months	Spongiosis with large confluent vacuoles; perivacuolar PrP staining
	VV1	44 (19–55)	21 (17–42)	Dementia at onset, later ataxia and extrapyramidal	Severe pathology in the cerebral cortex and striatum with sparing of brainstem nuclei and cerebellum
	p-MM1 ^a	58 (48–70)	22 (13–38)	Progressive dementia and neurologic signs for several months	Moderate to severe pathology. MM1-like lesion profile. Widespread PrP amyloid plaques in subcortical and deep nuclei white matter

^ap-, with PrP amyloid plaques in white matter.

4.1.5.1.1 SubtipoMM1/MV1:

Estos dos subtipos se consideran uno solo ya que fenotípicamente son indistinguibles. Es considerada la forma clásica de eECJ y corresponde al 65% de los casos. Los síntomas iniciales, aunque no siempre aparecen, se caracterizan por deficiencia cognitiva, signos visuales, disfunción lingüística, ataxia y mioclonía (Parchi, et al., 1999; Zerr et al., 2000).

Histopatológicamente se relaciona con una espongiosis clásica consistente en vacuolas pequeñas que afectan esencialmente el neuropilo del lóbulo occipital, cuerpo estriado, tálamo, tronco encefálico e hipocampo. En la capa molecular del cerebelo, aparece de forma focal.

Inmunohistoquímicamente, los depósitos de PrP^{Sc} son de tipo sináptico localizado principalmente en la corteza frontal y el cerebelo; en menor medida aparece en los ganglios basales y el tálamo (Parchi et al., 2012). A veces también pueden presentar un patrón coalescente (Parchi et al., 1999).

4.1.5.1.2 Subtipo VV2

Descrito en el 15-20% de los pacientes afectados por eECJ. Se caracteriza por síntomas cerebelares en fases iniciales. Además la clínica incluye signos visuales, pérdida de memoria, cambios de comportamiento y afectación del sistema nervioso periférico. Signos como la deficiencia cognitiva, la demencia y mioclonías son más tardíos (Baiardi et al., 2017).

Histopatológicamente se ve afectada la sustancia gris del sistema límbico (subcortical), el cuerpo estriado, tálamo, hipotálamo, cerebelo, tronco encefálico y neocórtex, que se ve afectado de forma más difusa.

La inmunohistoquímica muestra unos depósitos de PrP^{Sc} tipo placa, además de un depósito sináptico y perineuronal prominente (Parchi et al., 1999 y 2012; Baiardi et al., 2017).

4.1.5.1.3 Subtipo MV2K

El porcentaje de individuos afectados es del 10% y presenta muchas similitudes con el fenotipo VV2, pero se diferencia en que se observa una progresión más lenta. Los signos clínicos iniciales son variables comenzando normalmente con demencia, aunque se han registrado casos que comienzan con ataxia o signos piramidales.

Su principal característica neuropatológica distintiva es la presencia de placas tipo kuru en la capa granular del cerebelo.

Este subtipo presenta cambios histopatológicos similares al subtipo VV2 como la presencia de depósitos tipo placa (Parchiet al., 1999 y 2012; Zerr & Parchi, 2018).

4.1.5.1.4 Subtipo VV1

La frecuencia de este subtipo es del 1%, considerándose el subtipo más raro. Destaca por afectar principalmente a pacientes masculinos jóvenes. La clínica en estadios iniciales consiste en desórdenes psiquiátricos o cognitivos y conforme la enfermedad avanza comienzan a aparecer signos extrapiramidales y ataxia.

Las regiones corticoestriatales son las más afectadas, destacando el lóbulo occipital en el que se detecta cambio espongiiforme en las capas más profundas del córtex cerebral, viéndose las regiones subcorticales como el cerebelo, afectadas en menor medida. Se observa la presencia de neuronas balonizadas en la corteza cerebral.

Caracterizado principalmente por el depósito sináptico muy difuso en la corteza cerebral (Parchiet al., 1999 y 2012; Zerr & Parchi, 2018).

4.1.5.1.5 Subtipo MM2T

También es conocido como insomnio familiar esporádico. Es infrecuente y la clínica es muy heterogénea, destacando la ataxia o los fallos cognitivos frente a signos visuales o psiquiátricos. Cuando los pacientes muestran incapacidad de mantener o iniciar el sueño se relaciona con estadios avanzados.

Desde el punto de vista neuropatológico aparece una atrofia muy prominente en el tálamo y el núcleo de la oliva inferior, viéndose otras áreas cerebrales como el cerebelo, afectadas en menor medida. La espongiosis puede sólo afectar a la corteza cerebral, o incluso no estar presente. Es el único subtipo en el que el cuerpo estriado no se ve afectado.

La corteza cerebral es donde se encuentra la acumulación más significativa de PrP^{Sc} (Parchi et al., 1999; Puoti et al., 2012; Zerr & Parchi, 2018).

4.1.5.1.6 Subtipo MM2C

Esta variante cortical del subtipo MM2 se caracteriza por una demencia progresiva, fallos cognitivos, afasia, apraxia, signos visuales y cerebelares.

Desde el punto de vista neuropatológico es similar al subtipo MM1/MV1, a excepción del cerebelo que aparece poco afectado. La espongiosis se presenta con vacuolas grandes e irregulares (*coarse*), similares a racimos de uva.

Esta peculiar espongiosis además está estrechamente asociada a los depósitos de PrP^{Sc}, que son de tipo perivacuolar irregular (Parchi et al., 1999 y 2012).

4.1.5.1.7 Subtipo p-MM1

Establecido recientemente como un subtipo independiente, es muy poco frecuente. Posee características similares a MM1, aunque presenta una clínica muy lenta en comparación con el MM1 original.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Histopatológicamente se observan placas amiloides tipo kuru en zonas subcorticales y en núcleos profundos de la sustancia blanca (Kobayashi et al., 2008; Rossi et al., 2017).

4.1.5.1.8 Subtipos Mixtos

Tambiéne han descritos casos de eECJ denominados mixtos en los que concurren los tipo 1 y 2 de PrP^{Sc}. Estos subtipos mixtos incluyen todos los genotipos posibles para el codón 129, aunque en distinta frecuencia. Los pacientes que los presentan tienen una combinación de características fenotípicas de subtipos puros (Parchi et al., 2009).

El subtipo mixto más habitual es el MM1/MV1 + 2C, que resulta más frecuente de lo que cabe esperar, pero es difícil detectarlo por WB ya que este fenómeno aparece sólo en regiones restringidas como tálamo y corteza cerebral. El fenotipo clínico es similar a MM1/MV1, puesto que neuropatológicamente es igual al subtipo MM1, pero con depósitos focales de PrP^{Sc} tipo 2. Esto también se correlaciona con la clínica de los pacientes (Parchi et al., 2009).

También se han detectado otros subtipos mixtos como VV2+1, MV2k+ 2C y MM2T +C pero en casos muy raros, observándose de nuevo una confluencia de los correspondientes fenotipos puros (Parchi et al., 2009; Parchi & Saverioni, 2012).

4.1.5.2 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética (gECJ)

Aproximadamente del 10-15% de los pacientes diagnosticados de enfermedades priónicas tienen una base genética, es decir, una mutación en el gen *PRNP* que codifica para la PrP^C. Este gen está situado en el brazo corto del cromosoma 20 (20p12) (Ladogana & Kovacs, 2018). Sólo posee una copia con una longitud de 16 kb con tan sólo 2 exones (Puckett et al., 1991). La secuencia inicial de la PrP^C, codificada por el segundo exón, antes del proceso post-traduccional consiste en 253 aminoácidos que contiene una región inestable en el extremo N-terminal (región de octapéptidos) situada entre los aminoácidos 51 y 91 (Liao et al., 1986).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

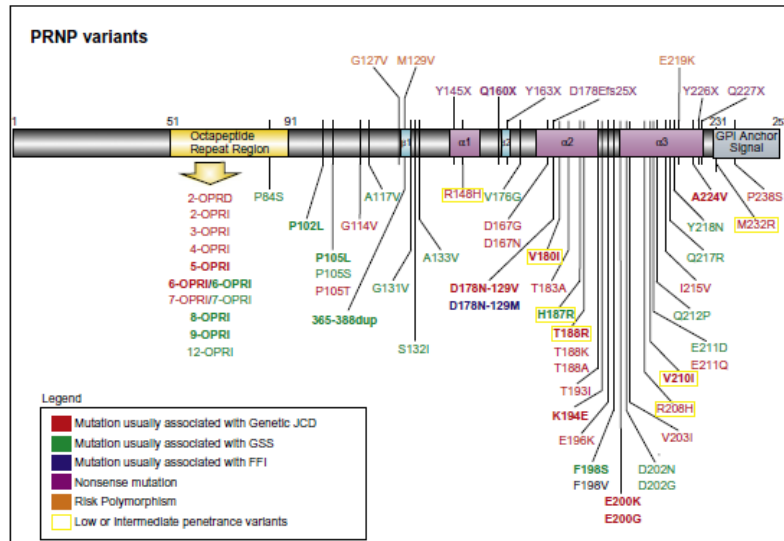


Figura 7.-Esquema del gen *PRNP* con los *loci* de las mutaciones descritas y los polimorfismos asociados con ECJ (Takada et al., 2018).

Todas las mutaciones que han sido descritas hasta el momento son autosómicas dominantes con diferente penetrancia (Ladogana et al., 2005), que aumenta con la edad (Mastrianni, 2010). Las mutaciones en este gen provocan además de gECJ, GSS, IFF. Alrededor del 50% de estas mutaciones se presentan sin un historial familiar, es decir, de forma espontánea provocando a veces un fenotipo desconocido hasta el momento. Por eso se prefiere el término gECJ más que a enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fECJ), referido a una herencia familiar. La mayoría de las mutaciones son muy raras y en muchas ocasiones originan un fenotipo más próximo a otra enfermedad neurodegenerativa que a una enfermedad priónica estándar (Schmitz et al., 2017).

La clínica depende del tipo de mutación. Habitualmente la enfermedad se origina en una edad más temprana en comparación con eECJ variando el rango de edad de inicio entre 30 y 70 años (Gambetti et al., 2003).

Todas estas mutaciones se clasifican en varios tipos (Schmitz et al., 2017; Ladogana & Kovacs, 2018; Takada et al., 2018):

- Mutaciones puntuales: afectan a un par de bases de un codón, provocando el cambio de un aminoácido. La más común en la población europea afecta a los codones 178, 200 y 210. En concreto, la mutación E200K o la V210I, que presentan una clínica y una neuropatología similar al eECJ. El fenotipo habitual suele presentarse como un gECJ típico, un GSS o IFF.
- Mutaciones por inserción: consisten en la inserción de pares de bases causando enfermedades atípicas que van desde un ECJ a un GSS.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Mutaciones STOP: consisten en mutaciones puntuales que generan un codón STOP produciendo una proteína prión anormal truncada; son muy raras y producen fenotipos muy inusuales que pueden ser desde un ECJ clásico a fenotipos que correspondan a otras enfermedades neurodegenerativas. Por ejemplo, la mutación Q160X presenta un fenotipo clínico similar a la EA (Jayadev et al., 2011). O la Q227X, que presentan AAC-PrP (Jansen et al., 2010). O la Y163X, que provoca fenotipos muy atípicos como la amiloidosis sistémica por PrP^{Sc} (Mead et al., 2013).

- Mutaciones en la región de octapéptidos: la mayoría consisten en inserciones de repeticiones de octapéptidos, es decir, aumento del número de octapéptidos (se han descrito desde 1 hasta 12). También existen deleciones de repeticiones de octapéptidos. Los fenotipos clínicos descritos varían desde ECJ clásico a GSS (Schmitz et al., 2017; Takada et al., 2018). En muchos casos existe una correlación entre la cantidad de inserciones con el inicio y la duración de la enfermedad. Se conocen mutaciones de deleción en esta región en las que los pacientes presentan fenotipos similares a otras enfermedades neurodegenerativas, tales como una deleción en el codón 82, que provoca un fenotipo similar a la EA (Perry et al., 1995).

Dentro de los polimorfismos del gen *PRNP* humano, el más importante de todos es el codón 129 (M; V). Como ya se ha mencionado, tiene una gran influencia en el fenotipo y susceptibilidad de las enfermedades priónicas, principalmente en el gECJ (Parchi et al., 1999; Kobayashi et al., 2015). Por ejemplo, en la mutación D178N, si el codón 129 codifica M, el fenotipo es similar a un IFF; en cambio, si codifica V es más parecido a un gECJ. Es decir, en muchas ocasiones el fenotipo depende de la mutación, pero según el codón 129 éste cambia (Goldfarb et al., 1992; Zarranz et al., 2005). Hay que especificar que esta influencia se observa cuando la mutación y el polimorfismo están en el mismo alelo en posición *cis* (Capellari et al., 2011). También existen otros polimorfismos como el M232R que se encuentra en pacientes sanos con una relativa alta frecuencia (Minikel et al., 2016), pero también representa un factor de riesgo elevado. Tiene una penetrancia muy baja y se han identificado pacientes de eECJ en los que aparece esta mutación (Beck et al., 2012; Ladogana & Kovacs, 2018).

En la gECJ aparece la PrP^{Sc} tipo 1 y tipo 2, pero determinadas mutaciones afectan a los ratios de las diferentes glicofomas (Hill et al., 2006).

4.1.5.3 Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iECJ)

La iECJ forma parte de las enfermedades priónicas adquiridas junto con el kuru y la vECJ. El término iatrogénico se refiere a que la fuente infecciosa está asociada a procedimientos médicos y/o quirúrgicos.

Aunque ya había sospechas previas en otros casos, este tipo se confirmó en 1974, asociado a un trasplante de córnea procedente de un cadáver (Duffy et al., 1974). Según los datos epidemiológicos (Brown et al., 2012), las causas principales de transmisión de iECJ son: la administración de hormona de crecimiento contaminada (226 casos) y a través de trasplante de duramadre (228 casos). Además, se han comunicado casos asociados a intervenciones en el ámbito de la Neurocirugía (4 casos) o la utilización de electrodos estereotácticos para EEG (2 casos), trasplante de córnea (2 casos), administración de hormona gonadotrópica (4 casos) o por transfusión sanguínea durante la epidemia de vECJ (4 casos; EUROCID, 2019)

Tanto la presentación clínica como la neuropatología que presentan los pacientes afectados de iECJ dependen de la vía por la que ha sido transmitida la enfermedad. Si la vía tiene contacto directo con el SNC, se asocia con una clínica y supervivencia similares a la de la vECJ. En cambio, si se asocia a una vía periférica de transmisión, suele presentarse un síndrome cerebelar progresivo con una media de supervivencia de 12 meses (Rudge et al., 2015; Will & Ironside, 2017).

Debido a la frecuencia relativa de los casos descritos de este tipo iatrogénico, se detallan a continuación los más estudiados:

4.1.5.3.1 ECJ asociado a trasplante de dura madre (dECJ)

El tiempo de incubación varía desde 1 año hasta 30 años y 11 meses. Debido a sus características neuropatológicas se consideran 2 tipos principales: con y sin placas (Noguchi-Shinohara et al., 2007).

Con placa: se denomina así porque aparece un depósito amiloide de PrP^{Sc} similar a las placas floridas encontradas en la vECJ (Shimizu et al., 1999). Se considera similar al subtipo de vECJ MV2 (Kobayashi et al., 2018)

La clínica, progresiva y relativamente larga, se caracteriza por un inicio con problemas progresivos en la marcha como ataxia. La neuropatología consiste en atrofia cerebral

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

moderada, depósito perineuronal dePrP^{Sc}, placas dePrP^{Sc} amiloide que se distribuyen por la sustancia gris cerebral así como la sustancia gris y blanca cerebelar. Algunas de estas placas están rodeadas de vacuolas, adoptando un aspecto de placa florida (Satoh et al., 2003; Yamada et al., 2009).

- **Sin placa:** se caracteriza por su similitud ala eECJ MM1/MV1, tanto en la clínica como en su neuropatología. Se caracteriza por un depósito de PrP^{Sc} sináptico y atrofia cerebral (Satoh et al., 2003; Yamada et al., 2009). Hay estudios realizados en animales de experimentación que asocian estos 2 tipos diferenciados a cepas de eECJ (Kobayashi et al., 2007 y 2009; Kobayashi et al., 2014).

Algunas evidencias apuntan que la infección con la cepa M1 de eECJ o su concurrencia con M1+M2C podría ser responsable de este tipo; y la cepa V2 sería responsable del anterior (con placa) (Kobayashi et al., 2018).

4.1.5.3.2 ECJ asociado a hormona de crecimiento humana (hGHECJ)

El periodo de incubación de esta enfermedad varía entre 5 y 42 años (Kobayashi et al., 2018), según algunos estudios, en relación con el genotipo que codifica el codón 129 (Rudge et al., 2015). La clínica más común inicial consiste en ataxia seguida de temblores, sensaciones dolorosas y de hipersensibilidad en las piernas, somnolencia, mareos, dolor de cabeza, mioclonias y deterioro cognitivo (Will, 2003; Rudge et al., 2015). Continúa con disartia, ataxia cerebelar, signos piramidales, incontinencia fecal e urinaria y finalmente mutismo acinético (Kobayashi et al., 2018).

De manera similar a dECJ, en este tipo de casos se consideran dos subtipos en función de sus características neuropatológicas (Delisle et al., 1993; Billette de Villemeur & Pradel, 1994; Croes et al., 2002; Cali et al., 2015):

Con placa: denominado así por la presencia de placas de forma similar al tipo placa hallado en la dECJ.

Sin placa: con características similares ala eECJ MM1/MV1.

De la misma manera que la dECJ, estos tipos podrían estar causados por cepas de eECJ (Cali et al., 2015). La cepa M1 o la concurrencia con M1+M2C estaría relacionado con el tipo no placa;

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

y el tipo placa estaría relacionado con la cepa V2. A diferencia del dECJ, en el hGHECJ la mayoría de los pacientes se muestran afectados por la cepa V2 mientras que la cepa M1 se encuentra poco representada (Rudge et al., 2015; Ritchie et al., 2017). Esta diferencia podría deberse a la ruta de infección, ya que en una es intramuscular o subcutánea y en la otra es intracerebral; la cepa M1 podría reducir su eficiencia infectiva en rutas periféricas (Kobayashi et al., 2018).

El análisis del codón 129 también es importante en la iECJ para conocer su resistencia a la enfermedad. La distribución de los polimorfismos para este codón es similar a eECJ, confiriendo resistencia a los genotipos heterocigotos (Brown et al., 2012), aunque también se han encontrado excepciones (Rudge et al., 2015).

4.1.5.4 Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)

Esta enfermedad está directamente relacionada con la EEB. Ambas aparecieron por primera vez en Reino Unido a finales del siglo XX, provocando un enorme impacto social y económico en toda Europa. La demostración del carácter zoonótico de la enfermedad bovina conllevó la aplicación de medidas de protección de salud pública bloqueando la industria cárnica y restringiendo las donaciones de sangre, al causar una de las más importantes crisis alimentarias de la historia (Diack et al., 2014) denominada “crisis de la vacas locas”.

La EEB fue detectada por primera vez en 1985 en ganado bovino (Wells et al., 1987). Posteriormente se demostró su transmisión de forma natural a otras especies animales (Aldhous, 1990; Bruce et al., 1994; Fraser et al., 1994; Kirkwood & Cunningham, 1994). Y diez años después se describió una forma atípica de la ECJ que se denominó “nueva variante de ECJ” (vECJ) (Will et al., 1996).

Más allá de la relación epidemiológica entre ambas enfermedades que indicaba la aparición de una nueva EET humana en el país más afectado por EEB, se identificaron otras evidencias biológicas como que la EEB y la vECJ poseían una migración idéntica en WB, denominada PrP^{Sc} tipo 4 o 2B (Collinge et al., 1996), o que en experimentos con modelo murino inoculado con ambos agentes etiológicos se confirmaba que era el mismo (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997; Brown et al., 2003; Ritchie et al., 2009).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

En 2016 el número total de casos ascendía a 231 (<http://www.cjd.ac.uk/data.html>) definidos como probables o definitivos de vECJ en todo el mundo, concretamente en 12 países, de los cuales el país más afectado fue el Reino Unido, país de origen. El origen de la vECJ ha sido asociado al consumo de productos cárnicos derivados del vacuno infectados con EEB (Ward et al., 2006) y se asume que la exportación de éstos desde el país de origen de la enfermedad fue el causante de la enfermedad en el resto de países (Sanchez-Juan et al., 2007).

Este tipo de ECJ tiene un inicio a edades más tempranas que la eECJ y la duración del periodo de incubación es de unos 14 meses; es significativamente más lenta que la eECJ. Presenta una fase inicial alrededor de 6 meses caracterizada por unos signos psiquiátricos como depresión, delirio o ansiedad (Zeidler et al., 1997) seguido por signos neurológicos característicos de ECJ (Zeidler et al., 1997).

La influencia del genotipo para el codón 129 es especialmente notable en este tipo de ECJ. Todos los casos definitivos o probables de vECJ hasta 2016 fueron MM, aunque también surgieron excepciones. Se constató un caso de un paciente asintomático infectado por vía secundaria sanguínea heterocigoto para este codón (Peden et al., 2004) y otro caso también heterocigoto definido como probable al no realizarse la autopsia (Kaski et al., 2009). No fue hasta 2017 cuando se publicó el primer caso de un paciente de vECJ definitivo presentando un genotipo heterocigoto MV para el codón 129 (Mok et al., 2017).

Diversos estudios utilizando líneas transgénicas murinas indican que el gradiente de susceptibilidad frente a la vECJ se establece en función del genotipo: MM > MV > VV (Hill et al., 1997; Asante et al., 2002; Bishop et al., 2006). Estos datos concuerdan con los datos vistos en la población, y acorde con estos datos, se podría hipotetizar una nueva epidemia de vECJ de pacientes que son asintomáticos actualmente.

Para comprobar esta hipótesis se realizaron una serie de estudios retrospectivos anónimos de tonsilas y apéndices donde todos los genotipos en mayor o menor medida mostraban depósitos de PrP^{Sc}, lo que confirmaba las sospechas (Frosh et al., 2004; Hilton et al., 2004; Clewley et al., 2009; de Marco et al., 2010; Gill et al., 2013).

Macroscópicamente sólo se encuentran anomalías en casos de larga duración y se identifican como atrofia de la corteza cerebral y atrofia cerebelar, principalmente en la vermis (Brandel & Knight, 2018). A diferencia del resto de formas de ECJ, en este tipo se ha evidenciado la implicación del sistema linfático y sistema nervioso periférico (Hill et al.,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1999). Como se había mencionado anteriormente, probablemente asociado a su curso patogénico.

A nivel microscópico presenta las lesiones descritas en el resto de enfermedades priónicas. La espongiosis se distribuye por la corteza cerebral de forma irregular afectando a todas las capas. El cortex entorrinal se ve afectado por cambio espongiiforme microvacuolar. El núcleo caudado y el putamen siempre muestran vacuolización confluyente, así como los ganglios basales. Este tipo de espongiosis es rara, apareciendo a veces en el cortex frontal y occipital. El tálamo presenta vacuolización focal. Cambios espongiiformes moderados se detectan en el hipotálamo, en la materia gris periacueductal del mesencéfalo, del puente y la médula, pero no en la espinal dorsal (Brandel & Knight, 2018). El cerebelo también muestra espongiosis, en concreto vacuolización confluyente en la capa molecular.

El hallazgo neuropatológico característico consiste en grandes placas de PrP^{Sc} fibrilares en el cortex cerebral, cerebelo, ganglios basales, tálamo e hipotálamo. Estas placas son similares a las tipo kuru, pero están rodeadas de un halo de vacuolas. También aparecen placas más pequeñas que se agrupan a menudo *en clusters*. Así como otro tipo de depósitos amorfos pericelulares, perivasculares y depósito sináptico en diferentes áreas cerebrales (Head & Ironside, 2012; Brandel & Knight, 2018)

Algunas evidencias apuntan a que sólo existe una cepa de vECJ, ya que a diferencia de otros tipos de ECJ, existe una uniformidad bioquímica y patológica en todas las áreas cerebrales (Brandel et al., 2009). Observaciones realizadas en estudios de transmisión experimental refuerzan esta idea (Diack et al., 2012), aunque algunos autores defienden la coexistencia de 2 cepas, aunque una de ellas sea predominante (Bishop et al., 2006; Beringue et al., 2008; Haik & Brandel, 2011).

4.1.6 Prionopatía variablemente sensible a proteasa (PVSPr)

Descrita en 2008 (Gambetti et al., 2008), aunque caracterizada y renombrada dos años después (Zou et al., 2010), es una enfermedad que abarca el 2% de los casos de enfermedades priónicas esporádicas humanas. No se han encontrado mutaciones en el gen *PRNP* asociadas a esta patología. Aunque los casos están extendidos por todo el mundo, hasta la fecha sólo se han reportado 37 casos (Notari et al., 2018), aunque se estima que pueda haber más casos, ya que esta enfermedad puede ser mal diagnosticada como otro tipo de demencia en la que no se realiza la autopsia habitualmente (Puoti et al., 2012). O también hayan podido ser

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

registrados como otro tipo de demencia debido a un diagnóstico erróneo en base a su atípica presentación. De hecho, uno de los casos corresponde a una anciana de 93 años que fue diagnosticada accidentalmente *post-mortem*, puesto que no presentaba ningún tipo de sintomatología clínica (Ghoshal et al., 2015). Durante un exhaustivo análisis de casos sobre enfermedades priónicas en el “*US National Prion Disease Pathology Surveillance Center*”, se detectó una serie de casos recurrentes en los que se demostraba la presencia de PrP^{Sc} en muestras de SNC mediante la técnica de inmunohistoquímica, pero no mediante las técnicas bioquímicas de electroforesis *immunoblot* (Notari et al., 2018). Al profundizar en ellos, se ha identificado un tipo diferente de PrP^{Sc} particularmente sensible a la digestión por proteinasa K, que en consecuencia, muestra un perfil de bandas distintivo mediante la técnica de WB, como se ilustra en la Figura 3.

Los pacientes afectados portan los 3 polimorfismos genéticos del codón 129 del gen *PRNP*. Aunque mayoritariamente los pacientes afectados presentan el genotipo VV y los menos afectados el genotipo MM (a diferencia del eECJ); en menor medida el genotipo MV y por último, MM.

La edad media de inicio de la enfermedad es de 70 años y la media de supervivencia del paciente es de unos 2 años. Presenta unos síntomas clínicos atípicos de demencia diferente a la presentada en los casos de eECJ. Incluye signos psiquiátricos como desinhibición, euforia, impulsividad y apatía, cambios de humor, deterioro en el habla y lenguaje daño cognitivo. Síntomas cerebelares, parkinsonismo, ataxia, mioclonia se desarrollan conforme avanza la enfermedad.

En relación con su diagnóstico, los tests clínicos usados para enfermedades priónicas típicas son a menudo ineficientes para detectar la PVSPr. El EEG también resulta ineficiente en estadios iniciales y la presencia de proteína 14-3-3 suele ser negativa. A pesar de que la RMN, como ya se ha enunciado en el capítulo anterior, es una herramienta muy específica y sensible para la forma esporádica de ECJ, no es capaz de mostrar imágenes típicas o compatibles con una enfermedad priónica en los casos de PVSPr. Sólo es observable una atrofia cortical difusa y cerebelar. Por todo ello, en muchas ocasiones han sido erróneamente diagnosticados como otro tipo de demencia, como la demencia frontotemporal lobar por la afasia y parkinsonismo que presentan, excepto cuando está muy avanzada.

A pesar de toda esta ambigüedad hay elementos como la ataxia y su rápida evolución clínica que sugieren clasificarlos dentro de las enfermedades priónicas. Pero también presentan otra

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

característica atípica que es el extenso periodo de incubación de la enfermedad (incluso hay casos descritos de 6 a 7 años; Head et al., 2013).

Histopatológicamente, independientemente del genotipo que presentan, comparten características similares con diferencias poco sustanciales. Espongiosis moderada a nivel de neocórtex cerebral, córtex entorrinal, ganglios basales y tálamo; también se observa una ligera espongiosis en la capa molecular del cerebelo y el hipocampo no afectado, presentando una distribución muy parecida a la de los casos de eECJ MM1, pero mucho menos severa, con un tipo diferente de vacuolas más grandes y que no llegan a ser confluentes como en el tipo eECJ MM2. El depósito de PrP^{Sc} forma unas placas pequeñas características de esta enfermedad. Éstas se localizan principalmente en la capa molecular del cerebelo y raras veces aparecen en el hipocampo, aunque existen estudios de su presencia en áreas dorsales del mesencéfalo. Estas poseen forma irregular. Los núcleos de estas placas pueden estar fusionados. Consisten en gránulos irregulares entremezclados con un depósito de tipo sináptico que se agrupan en *clusters*.

Muchos de los casos de PVSP muestran patología tipo tau en la corteza temporal, así como depósitos de A β , neuronas balonizadas sobre-ovillos neurofibrilares. Por ello, han sido diagnosticados como Braak tipo 2 o superior, o coexistentes con enfermedad de los cuerpos de Lewis, de los granos argirófilos y ELA (Notari et al., 2018).

4.2 Enfermedades *prion-like*

Muchas enfermedades neurodegenerativas como la EA, la enfermedad de Parkinson (EP) o de Huntington (EH), demencia frontotemporal (DFT) o ELA se caracterizan por la acumulación progresiva de una proteína aberrante (que se forma a partir de una isoforma fisiológica adoptando una conformación que resulta patológica) en el SNC. Existen estudios experimentales que indican que la formación de estas proteínas anormales se originan por la agregación germinal *prion-like*, provocando suproliferación y acumulación intra / extracelular, lo que constituye las alteraciones específicas de las diferentes enfermedades neurodegenerativas. Los tipos de depósitos proteicos resultantes, así como el fenotipo de la

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

patología asociada a cada una de ellas están controlados por el propio agente y el hospedador, de forma similar a las enfermedades priónicas (Jucker & Walker, 2018).

El papel del hospedador es importante. Ya que es en el que ocurre la germinación proteopática, provee de un ambiente bioquímico y fisiológico que mantiene o restringe la proliferación, auto-ensamblaje y propagación del agente etiológico. Este mecanismo germinal proteopático, consistente en que proteínas que adquieren una conformación alternativa son capaces de autopropagarse, fue identificado por primera vez en el grupo de las enfermedades priónicas. Una vez se encuentran en el organismo, ya tengan un origen infeccioso, genético o idiopático, se agrupan en un proceso similar a la cristalización, auto-replicándose e invadiendo diferentes áreas del SNC (Jucker & Walker, 2018).

Así, estas proteínas que están asociadas a diversas enfermedades neurodegenerativas comparten su mecanismo patogénico con las enfermedades priónicas: $A\beta$ (implicado en EA y en la angiopatía cerebral amiloide, AAC), proteína tau (en tauopatías, EA y otras enfermedades neurodegenerativas), α -sinucleína (EP, enfermedad de cuerpos de Lewis y atrofia multisistémica), huntingtina (EH) y varias proteínas asociadas como la superóxido dismutasa (SOD1) y la proteína de unión a ADN TAR-43 (TDP-43) dentro del espectro de los síndromes de DFT y ELA.

Al igual que la PrP^{Sc} en las enfermedades priónicas, todas estas proteínas poseen capacidad germinal autocatalítica que les permite replicarse y transmitirse célula a célula por diferentes regiones del SNC. Los estudios anatomopatológicos realizados sobre diversas secciones transversales indican que estos agentes no se distribuyen aleatoriamente, dando lugar a patrones espacio-temporales específicos de cada enfermedad (Braak et al., 2003; Braak et al., 2006; Brettschneider et al., 2013). Apoyando la observación anterior se ha confirmado *in vivo* que las conexiones neuronales median en la progresión de estos agentes entre regiones del SNC interconectadas (Iturria-Medina & Evans, 2015).

Y también tienen tendencia a formar amiloide. Generando conjuntos de pequeños oligómeros autopropagantes que pueden interrumpir las funciones celulares y tisulares. Se ha visto que estos gérmenes de $A\beta$ son ricos en lámina β , al igual que la PrP^{Sc} (Eisenberg & Jucker, 2012).

Por otro lado, estudios experimentales en modelo murino han demostrado una capacidad de propagación similar a la PrP^{Sc} de estos gérmenes de proteínas mal plegadas procedentes de extractos de encéfalo de pacientes afectados por varias enfermedades neurodegenerativas, resultando necesarios y suficientes para inducir su agregación en

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

estemodelo. Se ha logrado, tanto por vía intracerebral como por vía peritoneal, con A β (Kane et al., 2000; Meyer-Luehmann et al., 2006), proteína tau(Clavaguera et al., 2009; Clavaguera et al., 2014), α - sinucleína(Luk et al., 2012; Sargent et al., 2017),SOD1 (Ayers et al., 2014),TDP-43(Porta et al., 2018)o huntingtina(Jeon et al., 2016).Sin embargo, en modelos *wild type* el éxito de este proceso se evidencia de manera más restringida(Jucker & Walker, 2018), por lo que el factor del hospedador resulta clave en todas estas proteinopatías.Este proceso de transmisión también ha sido detectado en humanos asociado a procedimientos iatrogénicos. Por ejemplo, para A β se ha detectado tanto por vía periférica como intracerebral(Jaunmuktane et al., 2015; Frontzek et al., 2016; Hamaguchi et al., 2016; Ritchie et al., 2017). En el caso de la huntingtina, se ha visto la transmisión de esta proteína a tejido neuronal estriatal transplantado apacientes con una EH avanzada.Esta transmisión se produce desde el tejido del propio paciente hacia el tejido transplantado(Cicchetti et al., 2014).Para la α - sinucleína se ha descrito una situación similar(Kordower et al., 2008; Li et al., 2008).

En modelo murino se ha demostrado que la transmisión a través del SNC de la α - sinucleína (Luk et al., 2012; Rey et al., 2016)o de la proteína tau(Clavaguera et al., 2009; Liu et al., 2012; Clavaguera et al., 2013) es selectiva, a través de neuronas concretas, y se transporta a áreas anatómicas interconectadas, tal y como sucede en las enfermedades priónicas(Fraser, 1982; Kimberlin & Walker, 1986; Liberski et al., 2012; Rangel et al., 2014).

El concepto de cepa, hasta hace poco exclusivo de las enfermedades priónicas, también ha sido trasladado a otras enfermedades neurodegenerativas. En la EA se ha detectado la existencia de diversas cepas, incluso se ha evidenciado una heterogeneidad molecular y estructural de A β relacionada con diferentes subtipos clínicos(Watts et al., 2014; Qiang et al., 2017; Rasmussen et al., 2017; Di Fede et al., 2018).Se ha comprobado que esta proteína extraída de pacientes ancianos sin demencia muestra propiedades diferentes a la procedente de pacientes afectados de EA(Piccini et al., 2005). En relación con la proteína tau también se ha detectado este fenómeno(Kaufman et al., 2016; Narasimhan et al., 2017) mediante experimentos murinos en los que se inoculaban extractos de gérmenes de tau a partir de cerebros humanos afectados por diferentes tauopatías y se veía cómo se induce la formación de depósito proteico de tau siguiendo un patrón similar a la enfermedad originaria(Clavaguera et al., 2013; Boluda et al., 2015; Narasimhan et al., 2017). Observaciones similares se han obtenido a partir de estudios con α -sinucleína(Prusiner et al., 2015).De manera semejante a la PrP^{Sc}, los agregados de esta proteína han mostrado diferentes patrones de escisión con

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

proteínasa K, indicando la asociación con diferentes conformaciones moleculares (Guo et al., 2013).

Otra propiedad que comparten estas proteínas mal plegadas es la resistencia a la inactivización físico-química mediante el calor y la proteínasa K. En concreto, A β (Eisele et al., 2009; Langer et al., 2011), proteína tau (Kaufman et al., 2017) y α -sinucleína (Woerman et al., 2018). El tratamiento de A β con formaldehído también resultó ineficaz, tal y como ocurre frente a la PrP^{Sc} (Fritschi et al., 2014).

Desde el punto de vista neuropatológico, todas estas enfermedades neurodegenerativas comparten alteraciones con las enfermedades priónicas, como la muerte neuronal, la acumulación de proteínas mal-plegadas intra/extracelularmente con formación ocasional de placas amiloides y gliosis. Incluso un fenómeno considerado característico de las enfermedades priónicas como es la espongiosis también ha sido descrito en casos de EA, en la enfermedad de los cuerpos de Lewis y ELA (Smith et al., 1987; Sherzai et al., 2013; Saberi et al., 2015).

4.2.1 Enfermedad de Alzheimer (EA)

Se trata de una enfermedad neurodegenerativa progresiva irreversible descrita por Alzheimer en 1907 (Alzheimer et al., 1995). Es la principal causa de demencia a nivel mundial (Reitz & Mayeux, 2014). Existen varios subtipos en función de una serie de características. La EA de inicio tardío (LOAD o SAD) es el tipo más habitual, de origen esporádico, afecta a personas mayores de 60 años cuyo origen es desconocido, aunque se ha demostrado una influencia familiar (Gatz et al., 2006; Bertram et al., 2010). En concreto, se conoce que las variantes alélicas APOE4 o TREM2 aumentan el riesgo a padecer la enfermedad (Chouraki & Seshadri, 2014; Calero et al., 2015). Por otro lado, la EA de inicio temprano (EOAD o FAD) se considera de origen genético, provocado principalmente por mutaciones en 3 genes: 2 preselinas (PSEN1 y PSEN2) y una proteína precursora de amiloide (APP) (Gatz et al., 2006; Bertram et al., 2010). Por último, existen varios subtipos clínicos, una EA preclínica (sin síntomas aparentes) y una EA prodromal, en la que se detecta un leve déficit cognitivo (como estadios de amnesia; Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Existe una clasificación neuropatológica paralela que define 3 tipos: uno típico y dos atípicos, que no encajan en los estadios de Braak. Unopredominantemente límbico y otro sin afectación del hipocampo (Murray et al., 2011).

El cuadro clínico consiste en fallos cognitivos, como pérdida de memoria y dificultades en el lenguaje, y no cognitivos, de comportamiento o síntomas psiquiátricos (como depresión o alucinaciones; Burns et al., 1990).

Existen varias hipótesis sobre la posible patogénesis de la EA. La hipótesis colinérgica es la más antigua y se basa en que los pacientes afectados sufren una disminución de la actividad colinérgica debido a la disfunción de las enzimas acetiltransferasa y acetilcolinesterasa (Davies & Maloney, 1976; Barage & Sonawane, 2015).

La hipótesis tau se basa en la detección mediante valoración neuropatológica de depósitos anormales neurofibrilares de proteína tau intraneuronal (Trojanowski & Mattson, 2003). Se sabe que la pérdida de funciones fisiológicas de esta proteína provoca fallos a nivel del citoesqueleto (Roy et al., 2005) por ser una fosfoproteína codificada por el gen MAPT (localizada en el gen 17q21) que se encarga de regular la polimerización de los neurotúbulos. Por *splicing* alternativo, puede dar lugar a 2 isoformas de esta proteína tau con 3 ó 4 repeticiones que están hiperfosforiladas y que son las que se acumulan en los casos de EA (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

La hipótesis de la cascada amiloide propone que la neurodegeneración está provocada por la acumulación anormal de A β . Esta acumulación provoca daño neurítico y formación de ovillos de proteína tau que lleva a la disfunción y muerte neuronal (Hardy & Higgins, 1992). Según las evidencias genéticas y bioquímicas, esta hipótesis es la más aceptada (Goate et al., 1991; Kaye et al., 2003). A β es una proteína que se sintetiza en el SNC como producto de la escisión de una proteína transmembrana llamada APP, codificada por el gen *APP* (situado en el cromosoma 21). Esta escisión es causada por la enzima β -secretasa (BACE1) y el complejo γ -secretasa, en el que la presenilina interviene también (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017), pudiendo liberarse varios tipos de péptidos de A β dependiendo de la longitud del extremo C-terminal. Según el número de aminoácidos, los diferentes tipos de A β varían de 36 a 43, siendo el A β 40 y el A β 42 los más abundantes. La función de A β es muy poco conocida (Thal et al., 2015; Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

Macroscópicamente, se observa una atrofia creciente con la progresión de la enfermedad en áreas como corteza entorrinal, hipocampo, amígdala y regiones asociadas al neocórtex.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

También se observa una despigmentación del locus cerúleo (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

A nivel microscópico se definen además lo que se denominan signos positivos y negativos (Duyckaerts et al., 2009; Serrano-Pozo et al., 2011). Entre los signos positivos se incluyen las placas amiloides o seniles (Bamburg & Bloom, 2009), los ovillos neurofibrilares y filamentos en el neuropilo y las neuritas con tau hiperfosforilada acompañadas de gliosis. Es frecuente la AAC o congofílica, así como la degeneración granulovascular y los cuerpos de Hirano en el hipocampo.

Como signos negativos aparecen la pérdida neuronal y de elementos sinápticos (Duyckaerts et al., 2009; Serrano-Pozo et al., 2011; Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

Pero la neuropatología característica de esta enfermedad es la acumulación extracelular de A β formando depósitos en el parénquima y las paredes vasculares, e intracelular de proteína tau hiperfosforilada (Hyman et al., 2012). Hay que puntualizar que los depósitos de A β representan la parte visible del A β (McLean et al., 1999), ya que se ha demostrado que otra parte está presente en forma de oligómeros solubles con alta toxicidad (Walsh & Selkoe, 2007). Existen varias clasificaciones de los depósitos encontrados en la EA, que pueden ser difusos, focales o estrellados (Delaere et al., 1991).

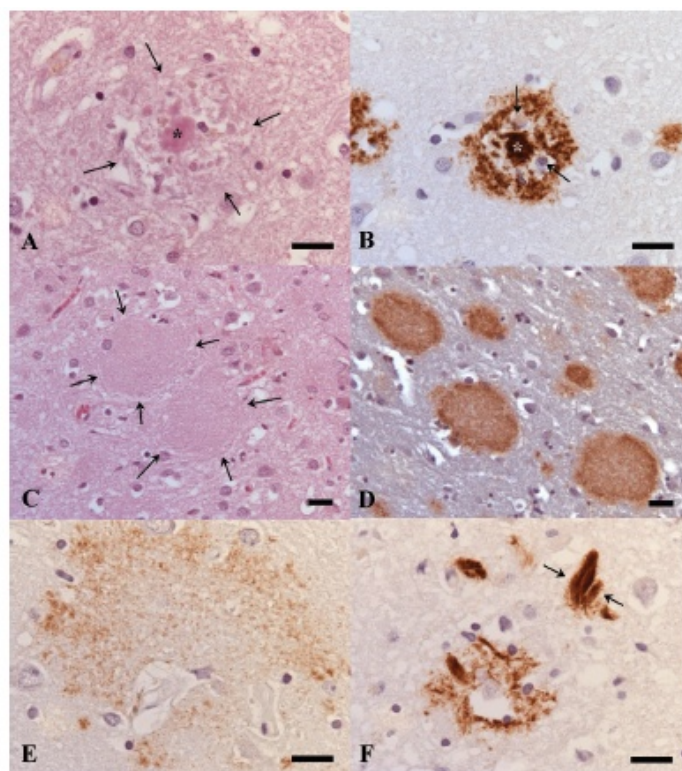


Figura 8.- Diferentes depósitos de A β teñidos mediante H/E (A y C) o IHQ frente a A β (B, D y F). (A y C) Placa senil, con centro (*) denso que se tiñe con rojo congo y flechas indicando los límites de la placa (C y D) *Cotton-wool plaques* (E) Placa difusa (F) *Ghost tangle* como depósito extracelular (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017)

Según la más general, se clasifican en placas difusas o placas con un núcleo denso que se tiñen con diferentes colorantes como el rojo congo y la tioflavina-S; las placas difusas generalmente aparecen en personas ancianas y las placas de núcleo denso están asociadas a personas enfermas. No se conoce el papel de estas placas amiloides, ya que personas mayores con las funciones cognitivas intactas las presentan (Serrano-Pozo et al., 2011). Las placas de núcleo denso consisten en un núcleo denso del que irradian filamentos extracelulares donde se localizan células gliales y neuritas distróficas, presentando un anillo exterior positivo frente a A β (Serrano-Pozo et al., 2011). Existe otro tipo de placas conocidas como *cotton-wool plaques*, asociadas principalmente al FAD (muy raras veces en el SAD), con una morfología esférica y que carecen de núcleo denso (Le et al., 2001). Otros autores distinguen entre placas primitivas, clásicas o *burn-out*, en función de la evolución de la placa (Serrano-Pozo et al., 2011). Algunas de estas placas se muestran en la Figura 8.

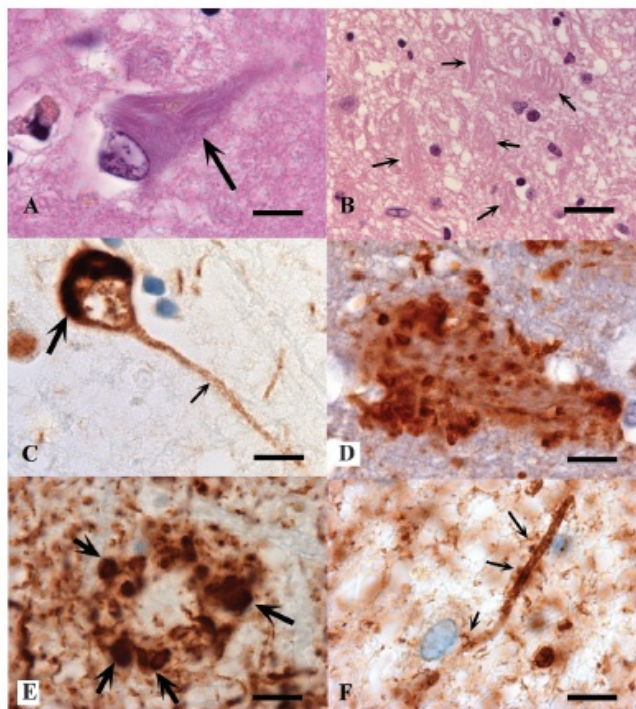


Figura 9.- Ilustración de la patología neurofibrilar teñida con (A y B) H/E o (C - F) IHQ frente a tau (A) Ovillo neurofibrilar dentro de una neurona (flecha) (B) *Ghost tangle* (C) Ovillo neurofibrilar de tau en el soma neuronal (flecha grande) y en las dendritas (flecha pequeña) (D) *Tangle-associated neuritic cluster* (E) Corona de placa senil (F) Proceso neuronal relleno de proteína tau (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017)

Los ovillos neurofibrilares mostrados en la Figura 9 son inclusiones de filamentos intracelulares formados por proteína tau hiperfosforilada mal plegada y son argirófilos (Braak & Braak, 1991). Morfológicamente se distinguen 3 tipos: pre-ovillos neurofibrilares (si no poseen elementos fibrilares), ovillos neurofibrilares maduros y ovillos neurofibrilares fantasmao *ghost tangle*, los únicos extracelulares (debido a la muerte neuronal). Este último puede formar un *cluster* de neuritas denominándose ovillo asociado a neuritas (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017). A diferencia de la A β , los patrones espacio-temporales de la proteína tau son mucho más predecibles (Braak & Braak, 1991; Braak et al., 2006). Por ello, se establecieron diferentes estadios para la proteína tau que se pueden resumir en tres: 1) los ovillos neurofibrilares están presente en la corteza entorrinal 2) avanzan hacia el sistema límbico y 3) llegan a la corteza cerebral (Braak & Braak, 1991). El avance de esta proteína aberrante va asociado a una degeneración neuronal (Braak & Braak, 1991; Serrano-Pozo et al., 2011).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Braak y Braak, propusieron un segundo sistema de estadios para el A β , aunque menos preciso, que diferencia tres fases: 1) Estadio A, en el que A β aparece en los lóbulos frontal, temporal y occipital 2) Estadio B, en el que toda la corteza se ve afectada junto con el hipocampo 3) Estadio C, en el que el A β avanza hacia otras áreas como el cerebelo, núcleo subcortical, cuerpo estriado, tálamo e hipotálamo entre otras (Braak & Braak, 1991).

Posteriormente, este estadiaje fue actualizado y denominado escala de Thal, proponiendo una progresión descendiente de A β que se puede resumir en 3 fases: 1) fase isocortical 2) fase límbica 3) fase subcortical (Thal et al., 2002; Serrano-Pozo et al., 2011).

A β también se puede acumular en las paredes vasculares constituyendo las lesiones características de la ACC mostradas en la Figura 10, consistentes en una microangiopatía (cuando afecta a capilares) o una macroangiopatía (cuando afecta a vasos de mayor calibre) (Greenberg & Vonsattel, 1997; Thal et al., 2002; Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

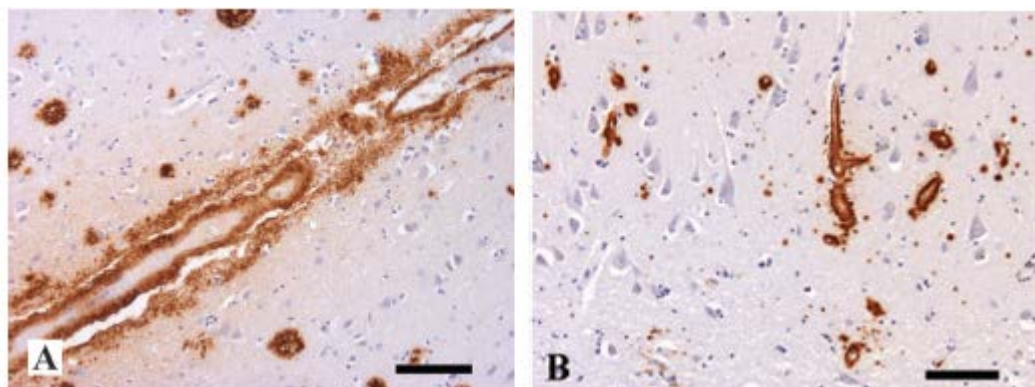


Figura 10.- AAC teñida mediante inmunohistoquímica (IHQ) frente a A β en diferentes localizaciones (A) En la pared arterial y parénquima perivascular (macroangiopatía) (B) En capilares (microangiopatía) (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

La degeneración granulovascular y los cuerpos de Hirano son lesiones presentes exclusivamente en el citoplasma de las neuronas piramidales del hipocampo, pudiendo aparecer también en personas adultas sin demencia (Ball, 1978; Xu et al., 1992). La primera lesión consiste en la acumulación de membranas celulares (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017). Los cuerpos de Hirano son inclusiones eosinofílicas, con forma de bastón que aparecen en casos de EA (Gibson & Tomlinson, 1977), pero originariamente fueron descritos en el síndrome de ELA-parkinsonismo-demencia de Guam (Hirano et al., 1968; Hirano, 1994), y también han sido vistos en casos de ECJ (Sikorska et al., 2009).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Aparece también una lesión conocida como hilos del neuropilo, principalmente formados por proteínatau con una morfología característica mostrada en la Figura 9 (Giannakopoulos et al., 2007; Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

Existe un criterio basado en el análisis de diferentes cambios neuropatológicos observados en EA. Este criterio para esta enfermedad denominado sistema ABC, está basado en la combinación de 3 escalas: A para el A β evaluado por la escala de Thal, B referido a los estadios de Braak, donde se evalúa la agregación de fosfotau, y C de CERAD (*Consortium to Establish a Registry for AD*), en las que se analiza la densidad de placas neuríticas (Hyman et al., 2012; Montine et al., 2012; Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017). Es frecuente el hallazgo de otras lesiones comórbidas como la presencia de cuerpos de Lewis, esclerosis del hipocampo, acumulación de TDP-43 (Josephs et al., 2014), así como lesiones vasculares que pueden estar relacionadas con AAC (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

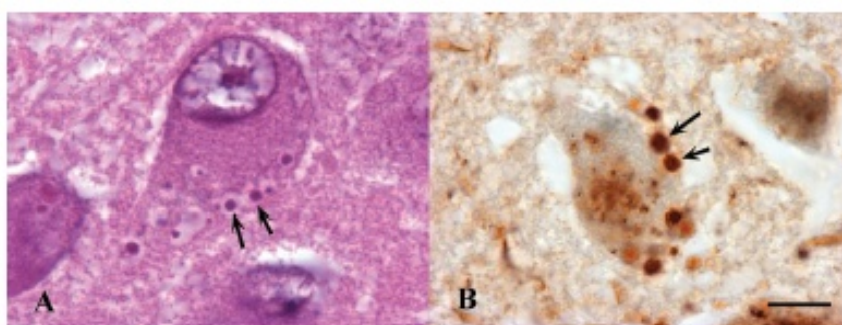


Figura 11.- Otros cambios neuropatológicos asociados a la EA (A) Degeneración granulovacuolar, gránulos eosinofílicos rodeados de un halo blanco tenidos con H/E (B) Gránulos perisomáticos teñidos con IHQ frente a ubiquitina (Calderon-Garciduenas & Duyckaerts, 2017).

4.2.2 Enfermedad de Parkinson (EP)

Enfermedad neurodegenerativa progresiva lenta incurable caracterizada por la muerte de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra. Esta muerte neuronal provoca un déficit dopaminérgico en los ganglios basales manifestándose a nivel clínico como un deterioro motor clásico parkinsoniano. Se conoce que están implicados otros neurotransmisores y otras regiones del SNC. Principalmente se considera una enfermedad esporádica que resulta de una compleja interacción entre factores genéticos y ambientales (Kalia & Lang, 2015), afectando mayoritariamente a personas a partir de 60 años. Aunque se ha propuesto que puede ser causado por la influencia ambiental como drogas o toxinas (Dickson, 2012), su origen genético ha sido confirmado. Se han identificado varias mutaciones autosómicas dominantes en diferentes genes como *SNCA*, *LRRK2*, *VPS35*, *EIF4G1*,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

CHCHD2 y *DNAJC1*; y mutaciones autosómicas recesivas, como *PARK2* relacionadas con la enfermedad (Kalia & Lang, 2015; Mullin & Schapira, 2015).

La patogénesis de esta enfermedad es desconocida. Existen hipótesis no concluyentes que se han asociado a fallos en diferentes procesos celulares como la regulación de la proteostasis, agregación de proteínas como α -sinucleína y tau, tráfico de membranas y proteínas en el citoplasma, funciones sinápticas, funciones mitocondriales, del sistema ubiquitina-proteosoma o la vía lisosómica-autofágica (Kalia & Lang, 2015).

Los síntomas clínicos se caracterizan por alteraciones motoras que incluyen bradiquinesia, rigidez muscular, temblores, fallos posturales y de la marcha (Gibb & Lees, 1988). Pero son heterogéneos y de hecho han servido para la clasificación en diferentes subtipos (Marras & Lang, 2013; Thenganatt & Jankovic, 2014; Kalia & Lang, 2015) que se han relacionado con diferentes etiologías y vías patogénicas (Marras & Lang, 2013).

-Temblor dominante.

- Con fenotipo acinético: inestabilidad postural, problemas en la marcha y rigidez acinética sin temblores.

- Atípico, que agrupa fenotipos mixtos o indeterminados.

Los síntomas no motores, como disfunciones olfatorias, deterioro cognitivo, síntomas psiquiátricos, problemas de sueño, dolor, fatiga y disfunción del sistema autónomo como el estreñimiento, suelen ocurrir en estadios previos a los síntomas motores, como parte de la fase prodromal, pudiendo manifestarse incluso 10 años antes (Martinez-Martin et al., 2011; Khoo et al., 2013).

No existe un diagnóstico definitivo en estadios tempranos. Siempre es *post-mortem*, mediante la detección de la presencia de degeneración en las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra junto a depósitos anormales de α -sinucleína denominados cuerpos de Lewis.

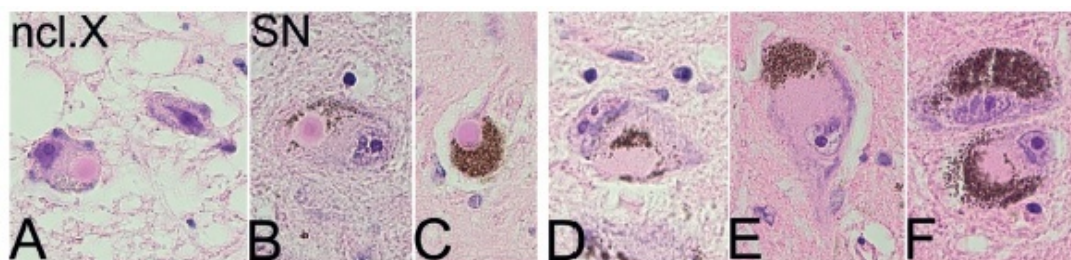


Figura 12.- Lesiones histopatológicas típicas de EP tenidas con H/E (A-C) Cuerpos de Lewis, estructuras eosinofílicas rodeadas de un halo localizado en neuronas del núcleo motor del nervio vago y la sustancia negra. (D-F) Cuerpos pálidos, carentes de halo. Modificado de (Alafuzoff & Hartikainen, 2017).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

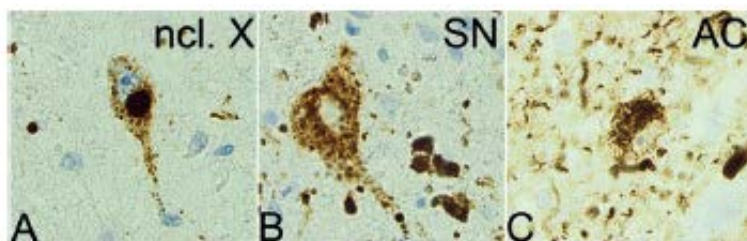


Figura 13.- Inmunohistoquímica frente a α -sinucleína. (A) Cuerpo de Lewis en una neurona del nervio vago. (B) Gránulos en una neurona de la sustancia negra. (C) Inclusión en una neurona de la amígdala. Modificado de (Alafuzoff & Hartikainen, 2017)

Desde el punto de vista microscópico, la patología característica es la ya referida degeneración de las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra, también de las neuronas del locus cerúleo, núcleo basal de Meynert localizado en la sustancia innominada, núcleo pedunculopontino, núcleos del rafe, núcleo dorsal del nervio vago, amígdala e hipotálamo (Dickson, 2012). Otra característica neuropatológica de la EP es la patología de Lewis, que consiste en la presencia de depósitos intracelulares de α -sinucleína, así como en los procesos neuronales denominados neuritas de Lewis. Algunos de estos depósitos se pueden observar en las Figuras 12 y 13 (Dickson et al., 2009). La patología de Lewis no sólo se limita al SNC, sino que aparece distribuida por varios órganos (Beach et al., 2010) y la toxicidad no sólo se asocia a estos depósitos, sino también a la presencia de oligómeros de esta proteína (Cremades et al., 2012). La EP es más compleja que la patología de Lewis (ésta no es exclusiva del Parkinson), e incluso se han descrito casos de EP genético de inicio temprano sin patología de Lewis (Doherty et al., 2013). Por otra parte, la presencia de depósitos de $A\beta$ y ovillos neurofibrilares descritos en la EA son a menudo detectados también en esta enfermedad (Irwin et al., 2012).

Han sido propuestos 6 estadios de distribución espacio-temporal de la patología de Lewis en la EP desde el sistema nervioso periférico hasta extenderse en los últimos estadios a las regiones corticales del SNC (Braak et al., 2003).

Algunos autores denominan algunas patologías como síndromes parkinsonianos por su relación con la EP, como es el caso de la demencia de Guam, la parálisis supranuclear o la demencia frontotemporal, entre otras. Así, esta clasificación resulta poco concisa al variar dependiendo no sólo del autor sino también de que la variable que se tenga en cuenta sea la sintomatología clínica o las características neuropatológicas (Dickson, 2012).

4.2.3 Enfermedad de Huntington (EH)

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Es una enfermedad neurodegenerativa genética fatal autosómica dominante en la que los pacientes muestran deterioro motor, cognitivo y síntomas psiquiátricos. Suele iniciarse a una edad adulta (a partir de 40 años) con una progresión irreversible y una duración media de 10 a 15 años (Ross & Tabrizi, 2011). Descrita por Huntington en 1872, está extendida por todo el mundo, aunque su frecuencia varía entre poblaciones, siendo entre 5-10 casos por 100.000 habitantes al año en Europa y Norte América (Borrell-Pages et al., 2006).

Los síntomas motores clásicos consisten en signos extrapiramidales como bradiquinesia, deterioro en la marcha, rigidez, mioclonías, alteraciones oculomotoras y del habla, siendo la corea el signo más llamativo (Ross & Tabrizi, 2011). Los síntomas cognitivos afectan a la comprensión, al juicio, a la memoria y al razonamiento. En estadios tardíos pueden desarrollar demencia (Harrington et al., 2012). Los síntomas psiquiátricos son principalmente depresión, problemas de sueño, ansiedad, apatía, irritabilidad, comportamientos y pensamientos compulsivos, siendo el suicidio la segunda causa de muerte (Ghosh & Tabrizi, 2018).

La etiología de esta enfermedad parece ser una mutación consistente en una expansión de las repeticiones del triplete CAG en el exón 1 del gen que codifica para la proteína huntingtina, situado en el brazo corto del cromosoma 4 (4p16.3). Como resultado de esta mutación surge una elongación de un tramo de poliglutamina en el extremo N-terminal de la proteína mutada (Ghosh & Tabrizi, 2018). Aunque se han identificado varios alelos (entre 10 a 35 repeticiones, siendo la media en la población de 18 repeticiones; Snell et al., 1993), la mutación comienza a ser deletérea y totalmente penetrante a partir de 40 repeticiones. Cuando presentan entre 36 y 40 repeticiones los individuos que la portan pueden o no manifestar algunos síntomas en edades muy tardías (Rubinsztein et al., 1996). Cuando el número de repeticiones es menor, en un rango de 27 a 35 repeticiones, suelen ser asintomáticos. En la descendencia de estos individuos se observa el fenómeno de anticipación, es decir, la descendencia puede adquirir mayor número de repeticiones y heredar la enfermedad (Zuhlke et al., 1993; Semaka et al., 2013). Por lo tanto, existe una correlación entre un mayor número de repeticiones con un inicio de la enfermedad más temprano, aunque parece existir además un factor ambiental o genético desconocido (Wexler et al., 2004). Incluso hay casos muy raros en personas menores de 20 años, en cuyos casos se denomina EH juvenil (Andrew et al., 1993). La huntingtina es una proteína estructural con un peso molecular de 350 kDa (Hoogeveen et al., 1993) que se expresa en todas las neuronas y células gliales (Rub et al., 2016; Figura 14). Participa en la vía endocítica, en el transporte axonal y en el movimiento anterógrado de las mitocondrias a lo largo de los axones, presentando actividad anti-apoptótica (Borrell-Pages et al., 2006; Rub et al., 2016).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La expansión del tramode poliglutamina causada por las mutaciones citadas, provoca un cambio conformacional que activa una cascada patogénica provocando depósitos de huntingtina anormal en el citoplasma, núcleo, dendritas o axón(Gutekunst et al., 1999; Borrell-Pages et al., 2006).Se piensa que la huntingtina mutada adquiere funciones tóxicas e interactúa con otras proteínas interrumpiendo funciones celulares(Borrell-Pages et al., 2006), aunque los depósitos de esta proteína no están correlacionadas con las regiones donde es más evidente la muerte neuronal(Gutekunst et al., 1999).

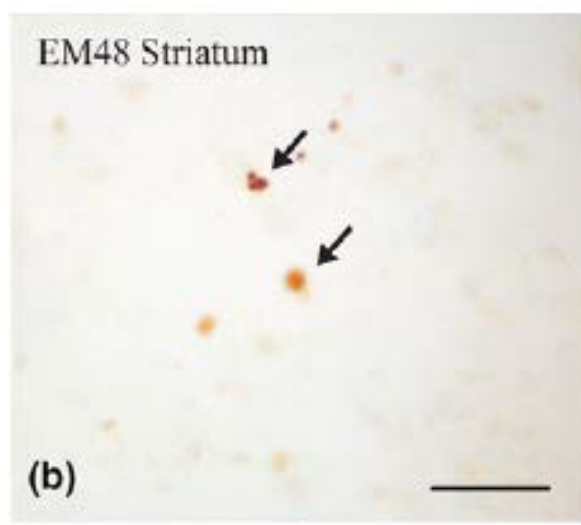


Figura 14.-Inmunohistoquímica frente a huntingtina en el cuerpo estriado (Waldvogel et al., 2015)

Macroscópicamente se observa atrofia cerebral, mientras que microscópicamente se caracteriza esencialmente por una degeneración neuronal del cuerpo estriado(núcleo caudado y el putamen)debido a la degeneración de la mayoría de las neuronas espinosas medias GABAérgicas que se proyectan hacia el globo pálido y la sustancia negra.Además,aparece una atrofia del córtex cerebral, de la sustancia blanca subcortical, del tálamo, delnúcleo hipotálamico y delglobo pálido(Halliday et al., 1998; Rub et al., 2016). Actualmente,algunos autores consideran que es un síndrome multisistémico que incluye afectación de otras áreas, como el cerebelo o núcleos del tronco encefálico donde la atrofia no es tan evidente (Rub et al., 2016).En función del grado de atrofia cerebral a nivel macroscópico, de la pérdida neuronal y el grado deastrogliosis en el cuerpo estriado a nivel microscópico,se han establecido 5 grados de afectación conocidos como sistema de gradación de Vonsattel(Vonsattel et al., 1985).

4.2.4 Demencia Frontotemporal (DFT)

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Los estudios epidemiológicos apuntan que la DFT afecta de 1,6 a 4,1 casos por 100.000 habitantes al año. Además, es la segunda causa de demencia más común en personas menores de 65 años. De forma general la media de edad de supervivencia es de 6 a 11 años desde el inicio de los síntomas, variando entre las diferentes patologías. El 40% de los casos tienen un historial familiar.

Es un síndrome neurodegenerativo que afecta principalmente a las regiones frontal y temporal del encéfalo. Compuesto por múltiples entidades neuropatológicas, es francamente heterogéneo y está asociado con diversas patologías neurodegenerativas. Por ello, la clínica es muy variable, aunque principalmente incluye cambios progresivos cognitivos implicados en el comportamiento, la personalidad, el lenguaje y la afectación motriz (Olney et al., 2017; DeLeon & Miller, 2018).

Existen unos subtipos clínicos principales que son (Olney et al., 2017; DeLeon & Miller, 2018):

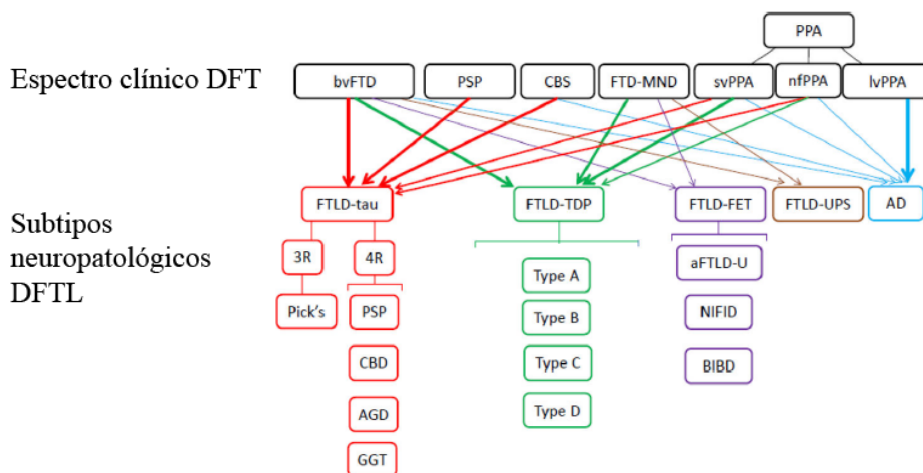


Figura 15.-Correlación entre los subtipos clínico y neuropatológicos dentro del espectro de la DFT (Olney et al., 2017).

Demencia frontotemporal variante de comportamiento

Es la variante más común y como su nombre indica, se manifiesta con anomalías del comportamiento como la desinhibición, pérdida de empatía, comportamiento compulsivo (golpear, frotar o morderse los labios), cambios en la dieta, hiperoralidad incluso pueden llegar a aparecer comportamientos delictivos. Estos cambios se corresponden con atrofia y disfunción de las áreas paralímbicas medial y frontal, la corteza frontal orbital, el córtex cingulado anterior, y la corteza frontoinsular. La atrofia es a menudo más prominente en el hemisferio derecho.

Las afasias progresivas primarias, se refieren a un grupo de síndromes neurodegenerativos que implican fallos en el lenguaje, incluyendo la afasia progresiva primaria variante agramatical no fluida, la afasia progresiva primaria variante semántica y la afasia primaria logopédica, neuropatológicamente más relacionada con la EA.

Afasia progresiva primaria variante agramatical no fluida

Se caracteriza por un "agramatismo", déficits en el habla y la búsqueda de palabras, incluso introducen sonidos erróneos inconscientemente. Se detecta atrofia de las áreas de Broadman 44 y 45; también llamadas área de Broca, en el giro izquierdo inferior frontal y la ínsula.

Afasia progresiva primaria variante semántica

Consiste en una predominante pérdida del conocimiento de objetos y palabras. Pueden aparecer síntomas de comportamiento similares a los de la bvDFT. Se observa una atrofia bilateral anterior del lóbulo temporal.

Estas afasias son los subtipos clínicos principales, pero también existen otros dentro del espectro de la DFT: demencia frontotemporal asociada a enfermedad de la motoneurona (FTD-MND), parálisis supranuclear progresiva (PSP) y síndrome corticobasal (SCB; Olney et al., 2017).

El diagnóstico clínico de estas enfermedades es muy complicado, ya que los síntomas iniciales se confunden con enfermedades psiquiátricas, por lo que existe un alto riesgo de diagnóstico erróneo. Por otro lado, existe una correlación entre el desarrollo de los síntomas y las áreas a

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

las que se extiende la afectación. De hecho, la valoración de áreas afectadas mediante RMN resulta de gran ayuda en el diagnóstico clínico (Olney et al., 2017).

Desde el punto de vista neuropatológico, el término correctamente usado es degeneración frontotemporal lobar (DFTL). De manera estricta, es definido como un proceso neurodegenerativo que produce una muerte neuronal selectiva así como gliosis en los lóbulos temporales y frontales del encéfalo (Mackenzie et al., 2009). Pero en la práctica se aplica de manera estricta para poder abarcar los diferentes subtipos neuropatológicos asociados con los fenotipos clínicos de la enfermedad, ya que en muchos casos se observan más áreas implicadas que el lóbulo temporal y frontal. Estos subtipos neuropatológicos se clasifican en función de patrones inmunohistoquímicos de proteína acumulada.

Se agrupan en función de la proteína a la que se encuentran asociadas: tau (DFTL-tau), TDP-43 (DFTL-TDP), proteínas FET (DFTL-FET) o UPS (DFTL UPS) (Mackenzie et al., 2010; Olney et al., 2017). La correlación entre los diferentes subtipos clínicos y subtipos neuropatológicos de DFTL se explica en la Figura 15.

Degeneración frontotemporal lobar asociado a proteína tau (DFTL-tau)

Uno de los subtipos neuropatológicos más importantes en los que está implicada la proteína tau es la DFTL-tau. El conjunto de síndromes neurodegenerativos que abarcan una acumulación mayoritaria de inclusiones de proteína hiperfosforilada tau (Kovacs, 2017; Olney et al., 2017) se conocen como tautopatías. DFTL-tau se corresponde con una tautopatía primaria ya que estos agregados son la lesión principal. También existen tautopatías secundarias fuera del espectro de DFTL como por ejemplo el EA, en el que la proteína tau aparece como una lesión secundaria (Lebouvier et al., 2017).

Para entender la clasificación de las tautopatías hay que entender cómo se procesa la proteína. La proteína tau es encargada de ensamblar los microtúbulos. Su función es transportar y estabilizar las estructuras celulares, participando en diversas vías de señalización. El gen que codifica la proteína tau (*MAPT*), del que han sido descritas 15 mutaciones asociadas con DFTL-tau, se encuentra en el cromosoma 17 (17q21). Un *splicing* alternativo de este gen genera 6 isoformas diferentes: 3 de ellas generan la isoforma 4R y otras 3, la isoforma 3R. El ratio de ambas isoformas sirve para establecer la siguiente clasificación (Kovacs, 2017):

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Enfermedad de Pick (tau 3R)

Enfermedad mayoritariamente esporádica, aunque se ha demostrado su asociación a algunas mutaciones (como L315R o S320F). Puede presentar 3 fenotipos clínicos diferentes. La neuropatología muestra neuronas balonizadas que muestran en el citoplasma unas inclusiones grandes esféricas y argirofílicas conocidas como cuerpos de Pick; estas inclusiones están compuestas mayoritariamente por tau 3R, aunque en ocasiones puede aparecer tau 4R. En esta enfermedad se observa una atrofia de las regiones ventrales de los lóbulos frontal y temporal, así como del giro cingulado anterior y la ínsula (Olney et al., 2017).

- Parálisis supranuclear progresiva (PSP; tau 4R)

Esta enfermedad muestra pérdida neuronal y ovillos neurofibrilares en ganglios basales, tronco encefálico y cerebelo. Se caracteriza por presentar astrocitos en penacho y espinosos así como ovillos neurofibrilares esféricos en el núcleo subcortical y con morfología “de llama”. El citoplasma de los oligodendrocitos muestra cuerpos en espiral en el córtex cerebral. Las inclusiones están formadas por tau 4R, éstas se localizan tanto en la corteza como en el tronco encefálico o en el bulbo raquídeo (Olney et al., 2017).

- Degeneración corticobasal (DCB; tau 4R)

La característica principal de esta enfermedad desde el punto de vista neuropatológico es la presencia de placas astrocíticas, que consisten en placas compuestas por tau 4R hiperfosforiladas localizadas en los procesos astrocíticos. Al igual que en la parálisis supranuclear progresiva, se observan astrocitos espinosos, inclusiones neuronales granulares, ovillos neurofibrilares y neuronas balonizadas. La característica más distintiva es la presencia de depósitos tipo tau y cuerpos en espiral en la sustancia blanca subcortical (Olney et al., 2017).

- Tauopatía globular glial (TGG)

Es una tauopatía muy rara, cuya clasificación patológica es muy reciente. Tiene varios subtipos y está relacionada con el fenotipo clínico bvDFT y/o con la enfermedad de la motoneurona (MND). Presenta grandes inclusiones de tau 4R con forma globular en astrocitos y oligodendrocitos (Olney et al., 2017).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Enfermedad de los granos argirófilos (EGA)

En esta tauopatía se observan inclusiones de tau 4R argirófilas fusiformes que presentan formas redondeadas “de coma”, presentes en los lóbulos temporales y estructuras límbicas. Puede ocurrir de forma aislada o en el contexto de otras enfermedades neurodegenerativas como la EA (Olney et al., 2017).

- Degeneración frontotemporal lobar asociado a proteína TDP-43 (DFTL-TDP)

La TDP-43 o proteína TAR de unión al DNA 43, pertenece a una familia de ribonucleoproteínas nucleares encargadas del procesamiento y estabilización de microARN. No se conoce su función exacta, pero participa en funciones vitales para la célula. Está implicada principalmente en la ELA y la DFTL-TDP. Antes de 2011 se conocía como FTLD-U (ubiquitina positiva, tau negativa), ya que la proteína TDP-43 aparece en forma de agregados citoplasmáticos de las neuronas, lo que conlleva una ubiquitinización y una posterior degradación. Actualmente se divide en los tipos A, B, C y D (Olney et al., 2017).

- Degeneración frontotemporal lobar asociado a proteínas FET (DFTL-FET)

FET es el acrónimo de una familia de proteínas a la que pertenece la proteína de unión a ARN de fusión en el sarcoma (FUS). No se conocen bien sus funciones, pero se piensa que son similares a las de TDP-43. Inclusiones citoplasmáticas de esta proteína aparecen en pacientes de DFT y también en MND. Parece ser que las mutaciones en FUS están asociadas a MND, pero en DFT son esporádicas, por lo que se establece una estrecha relación entre ambas enfermedades en base a que, aunque con diferentes mecanismos patológicos, en ambas aparecen depósitos de esta proteína.

Las proteínas EWS y TAF15 también forman parte de la familia de las proteínas FET y junto con FUS están implicadas en otras patologías incluidas dentro del grupo de DFTL-FET como la enfermedad por inclusión neuronal de filamentos intermedios, la enfermedad de cuerpos de inclusión basófilos y DFTL atípica ubiquitina positivo (Olney et al., 2017).

Degeneración frontotemporal lobar asociado a proteínas UPS (FTLD-UPS)

Es una forma rara asociada a la mutación CHMP2B en el cromosoma 3. También se ha asociado a FTD genético y ELA. Presenta inclusiones de ubiquitina, pero es negativa para tau, TDP-43 y proteínas FET (Olney et al., 2017).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Por último, indicar que alrededor del 40% de los casos tienen un componente familiar, por lo que se considera una demencia frontotemporal genética. Aunque existen muchas mutaciones asociadas a esta enfermedad, las más importantes se localizan en el gen *C9ORF72* (implicado también en MND), el gen *MAPT* (que codifica tau) y el gen *GRN* (que codifica progranulina) (Olney et al., 2017).

4.2.5 Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

Enfermedad neurodegenerativa fatal considerada la principal patología de las neuronas motoras. Esta entidad es también conocida como la enfermedad de Lou Gehring o Charcot.

Muchas evidencias apuntan que desde el punto de vista clínico, genético y patológico se solapa con la DFTL. Por otro lado, es preciso indicar que esta enfermedad se encuentra incluida dentro del espectro de las enfermedades de la motoneurona (MND) (Hortobagyi & Cairns, 2017).

Desde el punto de vista clínico provoca una parálisis progresiva que lleva a la muerte por fallo respiratorio. La duración de esta enfermedad es de 3 a 5 años desde que comienzan los primeros síntomas (Ajroud-Driss & Siddique, 2015).

El origen de esta enfermedad puede ser esporádico o genético, considerándose un 90% de los casos como esporádicos y un 10% genéticos. Todas las mutaciones que causan la forma genética son autosómicas dominantes, y muchas están implicadas en la DFTL (Al-Chalabi et al., 2012). La primera mutación causante directa de esta enfermedad fue descubierta en el gen *SOD1*, que codifica para la proteína superóxido dismutasa 1 (Rosen et al., 1993). Aunque no todas se consideran responsables de la aparición de la enfermedad, actualmente se conocen más de 100 mutaciones en este gen que se encuentran relacionadas con diferentes fenotipos de la enfermedad. Por ejemplo, las mutaciones en el gen *TARDBP* se asocian a un fenotipo similar al ELA esporádico, pero con mayor implicación bulbar (Gitcho et al., 2008; Sreedharan et al., 2008). Mientras, las mutaciones en la proteína FUS y otras proteínas de su familia y la de proteínas FET también causan ELA genético, estando implicadas en la DFT, como se ha mencionado con anterioridad (Vance et al., 2009; Al-Chalabi et al., 2012). Mutaciones en el gen *C9ORF72* también se asocian a fenotipos del espectro de ELA /DFT (Murray, DeJesus-Hernandez, et al., 2011). A su vez, todas estas mutaciones también constituyen un factor de riesgo en la forma esporádica de ELA (Al-Chalabi et al., 2012; Hortobagyi & Cairns, 2017).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

No es habitual observar ningún cambio macroscópico en el encéfalo, sólo en ciertas ocasiones se observa una atrofia del giro precentral. La médula espinal no muestra anomalías, sólo a veces, como característica específica, un adelgazamiento de las raíces nerviosas anteriores con una decoloración parda de las leptomeninges y del propio nervio (Hortobagyi & Cairns, 2017).

Microscópicamente se observa una pérdida masiva de neuronas piramidales motoras grandes, tanto superiores (células de Betz) localizadas en la corteza motora primaria, como inferiores, que se localizan en el asta anterior de la médula espinal.

Se observa gliosis en el giro precentral (corteza motora primaria). Y cuando la pérdida de motoneuronas es muy marcada se puede apreciar palidez en la mielina. Incluso se puede encontrar zonas de espongirosis en este área encefálica (Saberri et al., 2015).

En pacientes ancianos aparecen lesiones características de otras enfermedades neurodegenerativas como placas de A β , ovillos neurofibrilares o cuerpos de Lewis.

En el tronco cerebral, en concreto en el núcleo del nervio hipogloso de la médula oblongada, en el núcleo motor del nervio del trigémino y en el núcleo motor del nervio facial localizado en el puente, se observa una pérdida significativa de neuronas, gliosis y depósitos proteicos o inclusiones (Hortobagyi & Cairns, 2017).

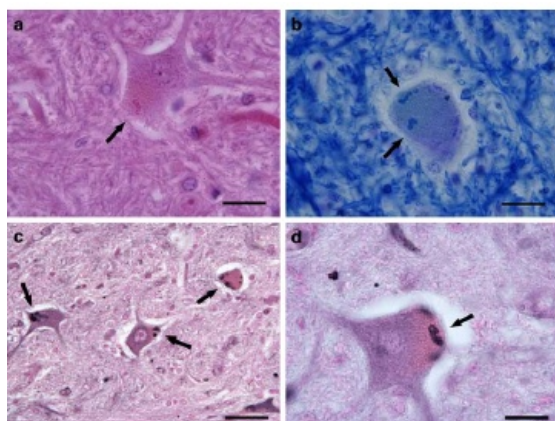


Figura 16.- Cuerpos de Bunina teñidos mediante (a) H/E en una neurona del cuerno anterior de la espina dorsal (b) Técnica Kluver-Barrera (c) IHQ frente a cistatina C (d) Detalle de c) (Yokota et al., 2006)

Histopatológicamente las motoneuronas del cuerno anterior de la médula espinal se ven afectadas (Hortobagyi & Cairns, 2017), evidenciándose pérdida de mielina en los axones del tracto lateral y anterior de la médula espinal (Saberri et al., 2015).

En ocasiones pueden aparecer cuerpos de Bunina, que son un tipo de inclusiones eosinofílicas citoplasmáticas (Figura 16) y aunque con menor frecuencia, también cuerpos de Lewis. En esta área la degeneración neuronal y la patología axonal también es frecuente.

En pacientes con una supervivencia muy alta se ha visto que la patología invade zonas extramotoras (Hortobagyi & Cairns, 2017). Los músculos esqueléticos se ven afectados, encontrándose atrofia neurogénica con grupos de pequeñas fibras acompañadas por una fibrosis endomisial y la acumulación de grasa. Los nervios periféricos muestran degeneración axonal, rotura secundaria de la mielina y acumulación de macrófagos en el endoneuro (Hortobagyi & Cairns, 2017).

En muchos casos aparecen cuerpos de inclusión que se tiñen específicamente con marcadores frente a ubiquitina, TDP43, FUS o SOD1, entre otras, que se localizan en el citoplasma o en el núcleo de neuronas y células gliales (Al-Chalabi et al., 2012; Hortobagyi & Cairns, 2017). En algunos casos de ELA se detecta la proteinopatía TDP-43. De hecho, parece ser que del mismo modo que sucede en otras enfermedades neurodegenerativas descritas en apartados anteriores (Vonsattel et al., 1985; Braak & Braak, 1991; Thal et al., 2002; Braak et al., 2003), se puede establecer un estadiaje en la progresión de esta proteína dentro del marco de la enfermedad (Brettschneider et al., 2013).

4.3 Neuroglía

Virchow fue el primero que propuso que en el SNC había otra población celular diferente a las neuronas, definiéndola como una sustancia conectiva del SNC. Tres décadas después Golgi, con la tinción argéntica conocida como método de Golgi identificó varios tipos gliales que describió como células redondeadas con prolongaciones que conectaban en algunas ocasiones con los vasos sanguíneos. Posteriormente, Weigert describió un tipo de glía fibrosa que se localizaba en la sustancia blanca diferenciándola de la glía de la sustancia gris. No fue hasta 1913 cuando Ramón y Cajal popularizó el nombre de astrogía utilizando una técnica de oro sublimado. Más tarde un discípulo suyo, Del Río Ortega descubrió un enigmático grupo celular diferente de neurona y la astrogía que denominó tercer elemento, y que correspondería a la oligodendrogía y microglía. Actualmente las células neurogliales se clasifican en dos

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

grupos, neuroglía periférica y del SNC. La periférica incluye las células de Schwann, satélites y otras específicas de cada órgano. La neuroglía del SNC incluye los astrocitos, los oligodendrocitos, la microglía y las células endocitales (Ross & Pawlina, 2015). Existen clasificaciones más exhaustivas (Reichenbach & Bringmann, 2017), como las que clasifican las células gliales del SNC como células microgliales y macrogliales, dividiendo a su vez este último grupo en varios tipos morfológicos generales: glía radial madura del SNC (tanicitos y células de Muller), astrocitos, diacitos, endocitos, células de los plexos coroideos, células epiteliales pigmentarias de la retina y oligodendrocitos. O los de otros autores que agrupan los tanicitos como un tipo de endocitología o consideran la glía de Muller como perteneciente al sistema nervioso periférico. Otros agrupan algunos tipos de macroglía basándose en la expresión de diferentes marcadores (Reichenbach & Bringmann, 2017). O incluso algunos consideran algunas células neurogliales dentro del grupo de los astrocitos como tanicitos, endocitos o pituiticos (Verkhatsky & Nedergaard, 2018).

No se sabe con exactitud ni el número de células gliales ni los ratios glía/neurona. Los números varían entre estudios y dependen del método de cuantificación, del área analizada y de la especie. Realmente no existe consenso, pero lo que está claro es que el número de células gliales es muy superior al número de neuronas (Hilgetag & Barbas, 2009; Herculano-Houzel, 2014; von Bartheld et al., 2016).

4.3.1 Astroglía

Como los oligodendrocitos y las neuronas, son de origen ectodérmico y neuroepitelial derivado de la glía radial (Kriegstein & Alvarez-Buylla, 2009). Presentan una alta heterogeneidad, tanto morfológica como funcional, pero se puede generalizar afirmando que se encargan del mantenimiento de las funciones del SNC desde el desarrollo hasta la vejez (Verkhatsky & Nedergaard, 2018), asumiendo funciones de:

- Sostén mecánico, definiendo la citoarquitectura de la sustancia gris, cubren todas las capas del SNC, incluso las capas más externas, formando las capas piales.
- Mantenimiento de la homeostasis a través de transportadores de iones y protones, que controlan el pH, la función catabólica y la eliminación de neurotransmisores y de especies reactivas de oxígeno.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Participación en la fagocitosis de la sinapsis durante el proceso de remodelación neuronal del SNC (esta función hasta hace poco era específicamente atribuida a las células microgliales (Chung et al., 2013).
- Participación en funciones defensivas del SNC, teniendo como objetivo restituir la homeostasis tisular y restablecerla normalidad tras el daño (Pekny et al., 2016).
- Participación en el impulso eléctrico, formando parte de las redes neuronales mediante la sinapsis tripartita, produciendo y surtiendo a las neuronas de diversos precursores de neurotransmisores.
- Control del balance energético y síntesis de glucógeno para suministrar energía a las neuronas.
- Establecimiento de uniones con los vasos sanguíneos a través de los pies vasculares cubriendo todo el sistema vascular del SNC y liberando sustancias vasoactivas que controlan una hiperemia funcional, constituyendo así una pieza clave en la barrera hematoencefálica.
- Participación en la neurogénesis a través de la glía radial. También en la neurogénesis adulta.

Es muy difícil establecer los diferentes tipos de células astrocitarias, ya que no existe un marcador específico de este grupo y se trata de un grupo muy heterogéneo desde el punto de vista morfológico. Incluso su morfología varía en función de la especie alcanzando la máxima complejidad en el ser humano (Oberheim et al., 2006 y 2009).

El término astroglia fue propuesto en el siglo XIX por Michael von Lenhossék, que clasificó como astrocitos protoplasmáticos aquellos localizados en la sustancia gris y como astrocitos fibrosos los que se localizaban en la sustancia blanca (Kettenmann & Verkhratsky, 2008; Verkhratsky & Nedergaard, 2018). Actualmente incluye varias subpoblaciones celulares con morfologías y funciones muy diferentes, cuya clasificación requiere el análisis mediante marcadores inmunohistoquímicos y moleculares (Kimelberg, 2004; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

- Astrocitos protoplasmáticos. Presentes en la sustancia gris del encéfalo, donde es más abundante, y en la médula espinal. En este tipo astrogliar se han detectado varias morfologías según la especie y el área cerebral. El soma, puede ser esférico, fusiforme o elongado del cual emanan ramas hasta formar procesos arborescentes. A veces están polarizados, ocupando un territorio determinado. Emiten procesos hacia los vasos sanguíneos llamados "pies chupadores"

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

perivasculares”y forman parte de de las capas piales(Bushong et al., 2002; Ogata & Kosaka, 2002; Emsley & Macklis, 2006; Lundgaard et al., 2014).

-Astrocitos fibrosos. Asociados principalmente a la sustancia blanca del encéfalo y de la médula espinal, nervio óptico y capa de fibras nerviosas de la retina.Los cuerpos celulares son más pequeños y sus procesos se alinean con las fibras axonales, emitiendo procesos de forma radial en la misma dirección que ellas.Poseen gran cantidad de procesos terminales finos, a diferencia de los astrocitos protoplasmáticos donde sus procesos son más similares a una vaina. También se diferencian por la ausencia de dominios, ya que sus procesos se sobrepone de forma que aparenta una menor organización. Sus prolongaciones establecen contactos con los nódulos de Ranvier, y con estructuras vasculares formando los pies chupadores y emiten prolongaciones formando parte de la capa subpial(Oberheim et al., 2009; Lundgaard et al., 2014).

-Astrocitos asociados a superficie.Subpoblación que se localiza en el córtex posterior prefrontal y amigdaloides. El soma se sitúa en la superficie cortical, emitiendo dos prolongaciones, una hacia la capa subpial y otra hacia una capa más interna (Feig & Haberly, 2011).

-Astrocitos velados.Variante morfológica de los astrocitos protoplasmáticos que se encuentran en zonas donde hay una alta densidad de neuronas de pequeño tamaño muy agrupadas, como el bulbo olfatorio o la capa granular del cerebelo. Se caracterizan por tener el soma pequeño y unos procesos cortos en forma de hoja que ocupan una superficie amplia con la que envuelven grupos de neuronas o partes de éstas(Chan-Palay & Palay, 1972; Buffo & Rossi, 2013).

-Astrocitos de Gomori.Localizados principalmente en el núcleo arcuato del hipotálamo, aunque pueden detectarse en más áreas cerebrales como el hipocampo. Acumulan hierro en su citoplasma y se identifican con una tinción específica, la H/E de Gomori(Young et al., 1990; Young et al., 1996).

-Astrocitos marginales. También conocidos como perivasculares, se localizan próximos a la pía madre, formando numerosos pies vasculares. Generalmente no contactan con neuronas (Liu et al., 2013).

- Glía radial.Son células bipolares que se extienden por el interior del tubo neural, tienen un pie basal vascular y uno o varios pies vasculares piales. Originalmente llamadas células epiteliales, son células neurales precursoras universales, que sólo aparecen durante el desarrollo cerebral(Barry et al., 2014).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

- Astrogliá radial. También conocida como glía radial adulta, tiene una función principal de regulación homeostática local a diferencia de la glía radial primaria, aunque se considera que toda la glía radial tiene capacidad neuroprogenitora. Hay diferentes poblaciones con morfología radial asociadas a diferentes áreas cerebrales: glía de Bergmann (en la capa molecular del cerebelo), glía de Müller (en la retina), glía radial del núcleo supraóptico, de la zona subventricular y del bulbo olfatorio. También aparecen poblaciones de astrocitos radiales en el hipotálamo, hipófisis, rafe y médula espinal (Barry et al., 2014; Verkhratsky & Nedergaard, 2018).

- Astrocitos interlaminales. Sólo se han descrito en primates y humanos. Poseen un soma de pequeño tamaño localizados en la capa I de la corteza cerebral. Sus fibras gliales conectan con la superficie pial y llegan a capas más profundas desde la corteza (capas II - IV), formando empalizadas y estructuras varicosas (Colombo & Reisin, 2004; Oberheim et al., 2009).

- Astrocitos polarizados. Son exclusivos de humanos y se encuentran presentes en la corteza cerebral. El soma se sitúa en la capa V y VI cerca de la materia blanca y poseen procesos varicosos (Oberheim et al., 2009).

4.3.1.1 Astrogliosis

Este término hace referencia a la respuesta de los astrocitos que sufren un cambio estructural/funcional frente a cualquier estímulo del SNC (Sofroniew, 2014a). Tiene un amplio espectro gradual, desde un cambio reversible hasta una alta proliferación celular con una compacta cicatriz glial y reconstrucción tisular. Además, dependiendo del área cerebral existe una gran variedad astrogliosis. Esto implica una heterogeneidad en la proliferación, morfología y expresión génica en una lesión o cambio neuropatológico (Sofroniew & Vinters, 2010).

La expresión de citoquinas / quimioquinas, moléculas de señalización, factores de transcripción, hormonas esteroideas, factores de crecimiento, incluso moléculas asociadas a las enfermedades neurodegenerativas como A β , muerte celular, presencia de bacterias y/o células ajenas al SNC, provocando diferentes estímulos en los astrocitos que inducen una hipertrofia y/o hiperplasia a la vez que importantes cambios en su transcriptoma, reflejando un cambio funcional y morfológico que se llama astrogliosis (Sofroniew & Vinters, 2010; Burda & Sofroniew, 2014; Sofroniew, 2014a).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

La astrogliosis se inicia como una adaptación frente al estímulo, un proceso beneficioso para reparar el tejido dañado o protegerlo. Sin embargo, bajo determinadas circunstancias, puede tener efectos perjudiciales, de manera comparable al proceso de inflamación (Sofroniew, 2014a). En modelos transgénicos para diferentes patologías del SNC en los que se utilizan animales con una ausencia de astrogliosis o cicatriz astrogliótica, se observa un incremento de la inflamación, con el consecuente daño del tejido, incluso con la pérdida de sus funciones (Sofroniew, 2014a). En otros estudios, se ha demostrado que la astrogliosis puede exacerbar la inflamación a través de la expresión de señales pro-inflamatorias (Brambilla et al., 2005; Brambilla et al., 2009). Los mediadores inflamatorios provocan la aparición de fenotipos citotóxicos beneficiosos durante una infección microbiana, pero perjudiciales durante una respuesta estéril como en los procesos patológicos de trauma, ataque o enfermedades neurodegenerativas (Hamby et al., 2012; Sofroniew, 2014b).

A pesar de tratarse de un proceso gradual, en la astrogliosis se pueden considerar diferentes estadios (Sofroniew & Vinters, 2010):

- 1) Estado basal, astrocitos en SNC sano.- Los dominios astrocitarios no se superponen, se observa escasa proliferación. No todos expresan proteína ácida fibrilar glial (GFAP).
- 2) Astrogliosis moderada.- La mayoría de los astrocitos se hipertrofian expresando GFAP.
- 3) Astrogliosis severa difusa.- Se pierden los dominios individuales y se produce una hiperplasia, aumentando la expresión de GFAP.
- 4) Astrogliosis severa con formación de cicatriz glial.- Actúa como barrera rodeando el tejido o regiones dañadas y provocando la inhibición de la regeneración axonal después de un daño del SNC (Silver & Miller, 2004).

Todas las enfermedades, incluyendo las enfermedades neurodegenerativas se definen de una forma muy general como fallos homeostáticos en un tejido, órgano o sistema. Durante muchos años en el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas ha predominado una visión neurocentrista donde todas las miradas de la patología del SNC se centraban en la muerte o supervivencia neuronal. Actualmente esa visión está siendo sustituida o amenazada por el relevante papel de la neuroglía, considerada un elemento central en la patología de estas enfermedades. Muchos autores consideran a la astrogliosis y sus cambios como ese elemento neuropatológico necesario para comprender la patología de los desórdenes neurológicos (Pekny et al., 2016; Verkhratsky & Parpura, 2016).

4.3.1.2 Microglía

Las células de la microglía son las células fagocíticas o macrófagos del encéfalo, la médula espinal, la retina y el bulbo olfatorio. A diferencia del resto de células neurogliales, su origen es mesodérmico. Sus funciones principales son (Ginhoux & Prinz, 2015):

- Fagocitosis, función con la que eliminan las células dañadas o apoptóticas en edad adulta, restos celulares, células tumorales y diversos microorganismos, incluidos los virus. Se trata de una función defensiva que está relacionada con la mayoría de las funciones que se enumeran a continuación (Boche et al., 2013).

- Implicación en el desarrollo embrionario del SNC mediante la eliminación de células apoptóticas, apoyando la neurogénesis, diferenciación y migración de las neuronas, crecimiento del axón, sinaptogénesis, generación y maduración de astrocitos y oligodendrocitos, así como la angiogénesis (Du et al., 2017).

- Neurogénesis y remodelación nerviosa en la edad adulta, participando en la destrucción o mantenimiento de las sinapsis.

- Mantenimiento y regulación de la barrera hemato-encefálica (Abbott et al., 2006).

- Soporte estructural y de organización del SNC y mantenimiento de su homeostasis.

- Como principal célula de la respuesta inmunitaria en el SNC frente a cualquier agente infeccioso, traumas, accidente cerebrovascular, enfermedades neurodegenerativas o regeneración tisular, puede actuar como presentadora de antígenos y posee capacidad citotóxica. Según algunos autores, constituye uno de los agentes principales en la neuroinflamación, capaz de producir y liberar citoquinas, quimioquinas y productos microbianos (Boche et al., 2013).

- Actualmente se le atribuye la participación directa en la sinapsis junto con astrocitos y neuronas (Kettenmann et al., 2013).

No existe un marcador molecular específico de este tipo celular glial. Algunos marcadores de células macrofágicas como el CD68 o el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHCII) las marcan, pero no son específicos de ellas. Recientemente han sido identificadas varias proteínas de membrana que las diferencian de otras células macrofágicas como

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

transportadores iónicos, proteínas de membrana celular asociadas con el metabolismo lipídico como LRP8, LPCAT3, STAB1, PAP2C o el receptor de membrana MFSD10(Lannes et al., 2017), aunque todavía no han sido puestos a punto los correspondientes anticuerpos para su detección histopatológica.

4.3.1.3 Activación microglial

La microglía en estado de reposo presenta una morfología ramificada que configura una red dinámica tridimensional por la que se mantienen en contacto entre ellas a través de uniones GAP (incluso se ha propuesto que podrían actuar como un sincitio). Así, escanean y controlan el ambiente interactuando con las neuronas y células gliales que las rodean(Nimmerjahn et al., 2005). Pero este tipo glial es una célula pleomórfica capaz 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. Varios autores defienden que este comportamiento de la microglía reactiva constituye una respuesta neuroprotectora a través de la liberación de neurotrofinas, aunque otros autores defienden que un exceso de sobre-activación o una activación crónica provocarían una respuesta citotóxica o neurotóxica, provocada por la fagocitosis neuronal, liberación de moléculas reactivas de oxígeno o factor de necrosis tumoral. Como ejemplo, se ha visto que la microglía rodea y aísla protegiendo el tejido sano de Aβ en la EA o en el caso de un trauma. En relación con esto ha sido descrito un tipo de microglía asociada a eventos patológicos denominada microglía oscura en base a su hiperactividad asociada al poder oxidativo que ofrece una imagen electrodensa en el microscopio electrónico (Bisht et al., 2016).

Estas hipótesis colocan a la microglía en el punto de mira de las enfermedades neurodegenerativas (Ransohoff, 2016; Guillot-Sestier & Town, 2018), siendo una de sus funciones más importantes vigilar y proteger frente a eventos patológicos. Así, cuando detecta alguna alteración en la homeostasis pasa de su estado de reposo a un estado activado sufriendo cambios en la expresión génica de marcadores como consecuencia de su cambio de funcionalidad. Estos cambios han sido agrupados en dos fenotipos principales *in vitro*:

- M1 o microglía activada, se considera la activación clásica. Tiene actividad pro-inflamatoria a través de la liberación de citoquinas como IL1β y factor de necrosis tumoral, así como especies reactivas de nitrógeno y oxígeno. Este fenotipo es activado por interferón-γ y lipopolisacáridos. Mediante la liberación de estos elementos se combaten las infecciones y el crecimiento de células tumorales, pero pueden causar

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

secundariamente un daño en el tejido nervioso, considerándose un procesoneurotóxico (Orihuela et al., 2016; Thompson & Tsirka, 2017).

- M2 o microglía activada alternativa con un perfil más anti-inflamatorio. Esta activación es mediada por la IL4 resultando en la inducción de una cascada de mediadores pro-inflamatorios. Parece ser que participan en la respuesta frente alergias, eliminación parasitaria, regulación inflamatoria y estar implicados en la remodelación o reparación tisular. Se han identificado varios subtipos denominados M2a, M2b y M2c que se diferencian en base a las sustancias químicas que los inducen y a la capacidad de liberar sustancias pro-inflamatorias o anti-inflamatorias (Orihuela et al., 2016; Thompson & Tsirka, 2017).

A su vez, en función de su morfología se distinguen varios tipos de microglía reactiva (Boche et al., 2013).

- Microglía ramificada: caracterizada por finos procesos que se extienden en un área determinada que sirven para controlar los cambios fisiológicos que se pudieran producir (Nimmerjahn et al., 2005).
- Microglía ameboide: presenta morfología esférica que adoptan en situaciones de fagocitosis, pierden sus procesos y además contienen numerosas vacuolas en su citoplasma. Se observa en respuesta a daño agudo, trauma, infarto o infección. Durante el desarrollo del SNC también tiene capacidad de poda sináptica además de eliminar neuronas aberrantes. Cuando la microglía desarrolla esta morfología adquiere una capacidad de movimiento, resultando indistinguibles de otros macrófagos.
- Células *rod-like*: son células en forma de bastón, con un núcleo elongado y escaso citoplasma. Tienen un reducido número de procesos. Esta morfología está asociada a enfermedades crónicas.
- Células multinucleadas: está asociada a una reacción fagocítica de material no digerible. Se puede observar en infecciones con micobacterias y raras veces en caso de AAC.
- Macrófagos epiteloideos: forman un *cluster* con forma de granuloma en infecciones crónicas.
- Microglía distrófica: está asociada a una disfunción relacionada con la edad. También ha sido observada en enfermedades neurodegenerativas.

4.3.2 Neuroglía en las enfermedades neurodegenerativas

4.3.2.1 Astroglía en las enfermedades priónicas

La astrogliosis se manifiesta en todos los casos a nivel morfológico como hiperplasia e hipertrofia astrocitaria (Lafarga et al., 1991 y 1993; Georgsson et al., 1993), apareciendo tanto en modelos experimentales como en el modelo natural (Liberski & Brown, 2004).

Muchos autores asocian este aumento glial al aumento de hallazgos neuropatológicos, aunque se pueden encontrar regiones con una alta astrogliosis muy poco afectadas (Liberski & Brown, 2004). En modelos experimentales se observa una alta vacuolización asociada a una astrogliosis severa (Liberski & Brown, 2004), aunque existen otros estudios que contradicen esta observación (Manuelidis et al., 1987; Georgsson et al., 1993).

Algunos otros hallazgos neuropatológicos asociados a la presencia de astrocitos en las enfermedades priónicas humanas han consistido en formas raras binucleadas en el córtex cerebral (Scrimgeour et al., 1983), clasmatodendrosis (fragmentación de las prolongaciones citoplasmáticas astrocíticas) o formas gemistocíticas (Liberski & Brown, 2004). Este término se refiere a una morfología astrocitaria asociada principalmente a los astrocitomas, aunque aparecen en otras situaciones patológicas mostrando una morfología con un citoplasma voluminoso y homogéneo y un núcleo excéntrico con prolongaciones celulares cortas y romas (Kros et al., 1996). Así como una clara, aunque no constante asociación, con varios tipos de placas amiloides observadas en enfermedades priónicas humanas (Liberski & Brown, 2004).

En estudios previos realizados en el modelo natural de Scrapie a nivel del cerebelo se ha demostrado que a pesar de ser las neuronas más afectadas de esta región, la PrP^{Sc} no se localiza intracelularmente en las células de Purkinje, mientras que se ha evidenciado su co-localización con la astrogliosis (Sarasa et al., 2012). Posteriormente ha sido posible correlacionar la morfología astrogliosis con diferentes estadios de la enfermedad (Hernandez et al., 2014).

Por otro lado, en modelos experimentales murinos se ha demostrado que es necesaria la presencia de PrP^C para desarrollar la enfermedad (Bueler et al., 1993; Prusiner et al., 1993), asumiendo que la propagación y el desarrollo de este agente es dependiente de las neuronas (Kretschmar et al., 1986). De hecho, se ha conseguido la infección experimental mediante la inoculación intracraneal en un modelo transgénico donde sólo las neuronas

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

expresaban la PrP^{Sc}, es decir, no era necesario otro tipo celular para que ésta progresara (Race et al., 1995). También en otro en el que la expresión de GFAP había sido interrumpida (Gomi et al., 1995). A pesar de estos hallazgos, la hipótesis basada en una patogenia exclusivamente “neurona dependiente” se encuentra actualmente muy discutida puesto que también se ha conseguido desarrollar la enfermedad en ratones transgénicos inoculados expresando la proteína exclusivamente en astrocitos (Moser et al., 1995; Raeber et al., 1997). Además, se ha demostrado que el primer tipo celular donde aparecen los depósitos de esta proteína mal plegada en estadios tempranos de la enfermedad es en astrocitos (Diedrich et al., 1991). Y en animales en estadio clínico de la enfermedad, la mayor acumulación de PrP^{Sc} se había detectado en la sustancia blanca, sugiriendo una implicación de las células gliales o de su transporte axonal (Taraboulos et al., 1992).

En modelos de cultivo celular también se ha demostrado la implicación de la astrogliá en la patogenia de estas enfermedades evidenciando su participación directa en la replicación de PrP^{Sc} en células neurales (Cronier et al., 2004) además de su capacidad de transmitir la PrP^{Sc} a otras células (Victoria et al., 2016). En células astrocitarias generadas a partir de células iPS (células madre pluripotentes inducidas) de origen humano se ha confirmado que su susceptibilidad a la infección por diferentes cepas de ECJ en modelo *in vitro* depende del codón 129 del gen de *PRNP*, siendo esta susceptibilidad similar en modelo natural y experimental (Krejciova et al., 2017).

4.3.2.2 Microglía en las enfermedades priónicas

Tradicionalmente, en las enfermedades priónicas se asumía una ausencia de participación del sistema inmune en su patogenia al no evidenciarse infiltración de leucocitos polimorfonucleares y manguitos perivasculares (Porter et al., 1973; Williams et al., 1994). Sin embargo, la presencia de microglía reactiva siempre ha sido un hallazgo histopatológico detectado en las enfermedades priónicas, que se consideraba secundario hasta que Sasaki et al. (1993) llevaron a cabo un estudio sobre los cambios morfológicos que sufrían estas células así como su distribución en el modelo natural de ECJ. Posteriormente, Eitzen et al. (1998) estudiaron una serie de casos afectados de ECJ en los que la microglía presentaba una morfología atípica que hacía suponer que estas células se veían dañadas por el transcurso de la enfermedad, correlacionando en ocasiones su localización con un fuerte cambio esponjiforme. En este estudio la microglía reactiva se localizaba principalmente en la corteza cerebral,

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

aunque parece que la limitación del número de casos llevó a esta conclusión errónea, ya que su localización se distribuye por más áreas cerebrales.

Los cambios distróficos detectados en la enfermedad de eECJ junto a la vacuolización intracelular sugirieron que la disfunción de estas células podría incluso favorecer la patogenia de esta enfermedad (Szpak et al., 2006). Por otro lado, la relación de este tipo celular con las placas amiloides (Miyazono et al., 1991; Sasaki et al., 1993) y el depósito de PrP^{Sc} ha sido constatado en varios estudios utilizando el modelo natural de ECJ (Sasaki et al., 1993; Muhleisen et al., 1995; Szpak et al., 2006).

Mediante estudios experimentales en modelos murinos se ha establecido una cronología de los hallazgos histopatológicos que han permitido conocer que la microglía reactiva aparece posteriormente al depósito de PrP^{Sc}, pero previamente a la muerte neuronal, incluso antes de la clínica, lo que apoya la hipótesis neurotóxica de este tipo celular (Betmouni et al., 1996; Williams, Lucassen, et al., 1997; Williams et al., 1997). Sin embargo, se ha demostrado que su activación es muy variable, y que probablemente está influenciada por la cepa y factores genéticos (Williams et al., 1994; Baker et al., 1999).

En estos últimos años se ha realizado un importante esfuerzo en establecer unos patrones microgliales en el ECJ que relacionen la intensidad o distribución de la microglía con las características moleculares que definen los diferentes subtipos de la enfermedad, tratando de establecer una relación entre el tipo de PrP^{Sc} y el estado de activación microglial (Puoti et al., 2005). Siguiendo con esta línea de investigación, Franceschini et al. (2018a) sugieren que la activación y extensión de la microglía se encuentra muy influenciada por la cepa priónica, el genotipo del codón 129 y la duración de la enfermedad. Todos estos resultados se correlacionan con las imágenes obtenidas *in vivo* mediante un estudio de tomografía de emisión de positrones (PET) (Iaccarino et al., 2018), así como de mediadores neuroinflamatorios estrechamente relacionados con la microglía (Llorens et al., 2014).

El papel real de este tipo glial en las enfermedades priónicas continúa siendo objeto de debate, ya que al ser una célula con capacidad inmunológica podría tener una función neuroprotectora o por el contrario una función neurotóxica, provocada por una sobreactivación capaz de provocar el daño neuronal. En modelos *in vitro*, la PrP^{Sc} induce la activación microglial aumentando la producción de citoquinas neuroinflamatorias (Peyrin et al., 1999). En modelo murino, también muestra su contribución al progreso de la enfermedad (Gomez-Nicola et al., 2013), sugiriendo un papel neurotóxico.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Por otro lado, otros estudios recientes apoyan la hipótesis neuroprotectora, ya que la supresión de la microglía en un modelo *ex vivo* (cultivos cerebelares organotípicos) aumenta la neurotoxicidad de la PrP^{Sc} (Zhu et al., 2016) y en un modelo *in vivo* murino reduce drásticamente la esperanza de vida de los animales (Zhu et al., 2016; Carroll et al., 2018).

La discordancia entre los resultados de estos estudios se justificaría en base al modelo experimental utilizado. Pero también a la presencia de varias subpoblaciones microgliales con múltiples estados de activación (Boche et al., 2013).

4.3.2.3 Neuroglía en enfermedades *prion-like*

Tradicionalmente, el concepto de neurodegeneración estaba asociado a la degeneración de unas poblaciones neuronales como las neuronas espinosas medias GABAérgicas del cuerpo estriado en EH o las neuronas dopaminérgicas de la parte compacta de la sustancia negra en EP. Esta hipótesis es conocida como proceso celular neurodegenerativo autónomo (Ransohoff, 2016), pero parece estar quedando obsoleta. No sólo porque las enfermedades neurodegenerativas se están considerando procesos neurodegenerativos multisistémicos, sino por el auge del papel neuroinflamatorio en la patogenia de estas enfermedades, colocando a la neuroglía en el foco de todos los estudios. Así, actualmente está siendo sustituida por la hipótesis de proceso celular neurodegenerativo no autónomo.

La presencia de gliosis o cierto grado de asociación de las células gliales a lesiones histopatológicas ya se había descrito en las enfermedades neurodegenerativas. En la EA (Mc Geer et al., 1987) describieron que la microglía activada era una señal de identidad en los enfermos de EA. Posteriormente, junto con Rogers (Rogers et al., 1988) vieron en un modelo *in vitro* que la microglía era capaz de producir sustancias potencialmente dañinas capaces de provocar neuroinflamación. Estos estudios comenzaron a cambiar la idea de que el encéfalo era un órgano quiescente (Streit et al., 2010).

Actualmente, en modelos transgénicos para la proteína SOD1 (modelo murino de ELA) las células mieloides, incluida la microglía, veía disminuida muy significativamente la presencia de esta proteína mutada. Sorprendentemente, estos animales mostraban un periodo de incubación de la enfermedad similar al de los ratones control, pero se veía significativamente aumentada su esperanza de vida (Boillee et al., 2006). Un experimento similar fue enfocado a la astrogliía obteniendo resultados similares (Yamanaka et al., 2008). Es decir, se propone que

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

la mutación en estos grupos celulares acelera la progresión, por lo que podrían convertirse en dianas terapéuticas (Boillee et al., 2006). Otro experimento que apoya estos resultados se basa en un modelo murino que expresa una mutación de la α -sinucleína humana exclusivamente en astrocitos, provocando una astrogliosis muy severa, activación microglial y el desarrollo de una enfermedad similar a EP (Gu et al., 2010).

Uno de los últimos hallazgos en relación con la neuroglía y su relación con las enfermedades neurodegenerativas se basa en la identificación en un modelo de cultivos celulares *in vitro* de dos tipos de astrocitos reactivos denominados A1 o tipo dañino, y A2 o tipo protector, implicados en la reparación tisular. El tipo A1 o tipo dañino ha sido identificado en muestras tisulares de varias enfermedades neurodegenerativas (Liddel et al., 2017). Inducido por la microglía, parece haber perdido la mayoría de sus funciones fisiológicas sustituyéndolas por una capacidad neurotóxica.

5 OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es analizar el comportamiento neuroglial en las enfermedades priónicas humanas mediante estudios neuropatológicos que permitan determinar las similitudes y diferencias con el observado en el resto de enfermedades neurodegenerativas denominadas *prion-like*. Finalmente, se pretende demostrar la implicación del sistema de protección del individuo en el proceso de la neurodegeneración.

Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificación de patrones neuropatológicos principalmente enfocados a las alteraciones astrogliales y microgliales en el cerebelo de pacientes afectados por enfermedades causadas por el mal plegamiento de una proteína (enfermedades priónicas y *prion-like*).
2. Análisis de la posible relación entre las alteraciones observadas en el objetivo anterior y las lesiones histopatológicas asociadas a cada patología.
3. Estudio comparativo de los cambios morfológicos, de intensidad y distribución de las poblaciones astrogliales y microgliales entre las prionopatías y otras patologías *prion-like* (EA, EP, EH, DFT y ELA).
4. Demostración de la posible correlación de estos cambios neurogliales en función del agente causal a través de su valoración en casos afectados por diferentes subtipos de las enfermedades priónicas.
5. Valoración de los mismos patrones neuropatológicos en otra área encefálica (corteza frontal) con el objeto de determinar si los cambios neurogliales son dependientes de la región valorada.

6 RESULTADOS

RESULTADOS

6.1 *GLIAL ALTERATIONS IN HUMAN PRION DISEASES: A CORRELATIVE STUDY OF ASTROGLIA, REACTIVE MICROGLIA, PROTEIN DEPOSITION AND NEUROPATHOLOGICAL LESIONS*

RESULTADOS

6.1.1 Abstract

Neuroinflammation has recently been proposed to be a major component of neurodegenerative diseases. The aim of this study was to determine how the interaction between microglia and astroglia, which are the primary immune cell populations in the brain, and pathological prion protein (PrP^{Sc}) could influence the development and propagation of this neurodegenerative disease. Because a relevant role for glial response in prion disease has been clearly demonstrated in our previous studies using the natural animal model, a similar approach has been taken here using the natural human model.

A morphological approach has been developed to analyze cerebellar samples from patients with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) in comparison with healthy control cases. Histopathological lesions were assessed, and PrP^{Sc}, GFAP and reactive microglia were immunolabelled by specific antibodies. Furthermore, co-location studies using confocal microscopy were performed to determine the possible relationships between both types of glial cells in all samples.

The results presented in this study support the involvement of both types of glial cells in CJD. Evidence of increased astrocyte and microglia reactivity can be observed in all CJD cases, and a close relationship between the types of glia is demonstrated by co-location studies.

Proteinopathies such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, where aberrant proteins spread throughout the brain during disease progression, may share a molecular basis and mechanisms of propagation. Therefore, studies elucidating the interaction between gliosis and prion propagation may be relevant to these other neurodegenerative diseases and may provide new targets for therapeutic intervention.

Keywords: prion diseases, neuroinflammation, astrocytes, microglia, cerebellum, immunohistochemistry

RESULTADOS

6.1.2 Introduction

According to the current neuroinflammation hypothesis associated with neurodegenerative diseases, the key element underlying the pathogenesis of these disorders involves microglial cells. Their activation is widely assumed to be a marker of pathogenic neuroinflammation in these disorders. Although microglia are generally considered the resident immune cells in the brain, the impact of astrocytes on inflammation cannot be understated (Jiang & Cadenas, 2014). Astrocytes can sense and amplify inflammatory signals from microglia and initiate a series of inflammatory responses, directly affecting neuronal functions. The term gliosis has been applied so broadly that it can either cease to impart useful information or be entirely misleading (Estes & McAllister, 2014), starting with inconsistent premises on some occasions. The lack of understanding of the actual neurodegenerative processes likely slows the progress of research in this field. In addition, while the pathogenesis of these neurodegenerative diseases remains unknown, no truly effective treatments can be identified that might prevent the onset or delay the progression of these diseases.

Current evidence supports the idea that many neurodegenerative diseases (those belonging to a prion-like disorder group; Prusiner, 2013) involve aberrant protein accumulation, similar to that observed in prion diseases, turning studies elucidating the mechanisms of prion propagation into useful tools for the study of other neurodegenerative diseases.

Although gliosis is always cited as one of the hallmarks of prion diseases, little research has been performed that focused on the involvement of glial cells in prion diseases to elucidate their roles. According to our initial studies regarding the pathogenic progress of Scrapie, as a prototype of prion diseases, astroglia is involved in Scrapie evolution (Hernandez et al., 2014). This glial population has been suggested to sustain active prion propagation (Sarasa et al., 2012) and to exist in a close relationship with the vacuoles that form the primary neurodegenerative lesion found in this group of diseases (Sarasa et al., 2015). Based on these encouraging results, the proposal here consists of extending the study on glial involvement from animal to human samples.

Previous studies have focused on the cerebellum for the following reasons. First, based on anatomical and physiological characterization, the cerebellum is particularly vulnerable to insults, and abnormalities in the cerebellum are usually easy to recognize (Sarna & Hawkes, 2003). Second, the cerebellum is one of the areas most affected by pathological prion protein (PrP^{Sc}) accumulation, regardless of the subtype associated with the affected individuals, and ataxia is one of the most frequent symptoms. Third, previous studies that focused on

RESULTADOS

microglial cells in prion diseases found no differences between the cerebellum and other brain areas (Wojtera et al., 2012); consequently, the conclusions drawn from studying the cerebellum can be extrapolated to the whole encephalon. In addition, this encephalic area has been proposed to serve as a pseudo-reference region to detect neuroinflammation (Lyou et al., 2015)

The specific goal of this study was to assess whether the expression of astroglia and reactive microglia markers in cerebellar sections from patients with Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) differed from those of control patients. This study also aimed to establish a possible relationship between the differential expression of glial and PrP^{Sc} deposition and/or neuropathological alterations in human cerebellar samples.

6.1.3 Materials and Methods

Samples

All samples were provided by the human tissue bank from *Hospital de Alcorcón* (HUFA Biobank, Madrid - Spain), following the guidelines provided by Spanish legislation.

Samples corresponded with a total of 25 CJD patients (Age range: 48 -82 years; Sex: male and female; Genotypes at codon 129 of *PRNP*: homozygous and heterozygous), including 22 sporadic and 3 familial cases (*PRNP* E200K mutation). Five additional samples were used as healthy controls (age range: 36 - 82 years).

Fixed sections (4% paraformaldehyde), corresponding to cerebellar sagittal samples at the vermal level, were obtained and included the granular, Purkinje cell, and molecular layers and white matter for all samples.

The studies performed on samples were approved by the Ethical Committee for Clinical Research from Government of Aragón (CEICA; REFERENCE NUMBER: PI15/0036, Acta N° 05/2015).

Methodology

Five-mm slices from each individual were paraffin-embedded, from which 5 µm sections were taken and histologically (hematoxylin-eosin staining, H/E) or histochemically processed, following formic acid treatment for prion inactivation. The remaining portions were processed for confocal microscope studies.

RESULTADOS

To detect PrP^{Sc}, GFAP and reactive microglia, immunohistochemical (IHC) protocols were followed, using specific antibodies in DAKO antibody diluents (Faramount DAKO, Glostrup - Denmark), on sections transferred to Vectabond-treated slides and incubated at 56 °C overnight. DAB PLUS was used as a chromogen, and hematoxylin counterstaining and mounting in mounting medium (Faramount DAKO, Glostrup - Denmark) were performed on all sections, regardless of the immunohistochemical protocol applied.

After HE staining, all samples were assessed by light microscopy to determine histopathological lesions. All of the layers from each sample were examined for spongiosis and subjectively scored according to the number of vacuoles, i.e., (-), absent to (++++), very abundant (Figure 17). After IHC processing, all marker immunostaining was scored from negative (-) to maximum (++++), by evaluating the density and the extent of the labelled deposits in each layer from each cerebellum, using light microscopy (Figure 18). The immunostaining morphologies of each marker were also assessed: linear, granular, spot, coalescent or plaques, for PrP^{Sc}; stellate, perineuronal or radial, for GFAP; ramified or amoeboid, for reactive microglia (Figure 19).

Studies using confocal microscopy were performed to assess the possible relationship between astrocytes and reactive microglia in all cases.

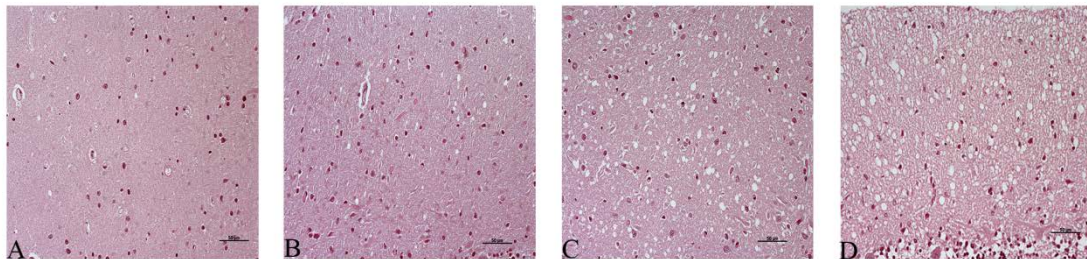


Figure 17.-The scoring system used after H/E staining to assess spongiosis by light microscopy, according to the number of vacuoles: from A) very scarce to D) very abundant (++++). Scale bars: 50µm.

RESULTADOS

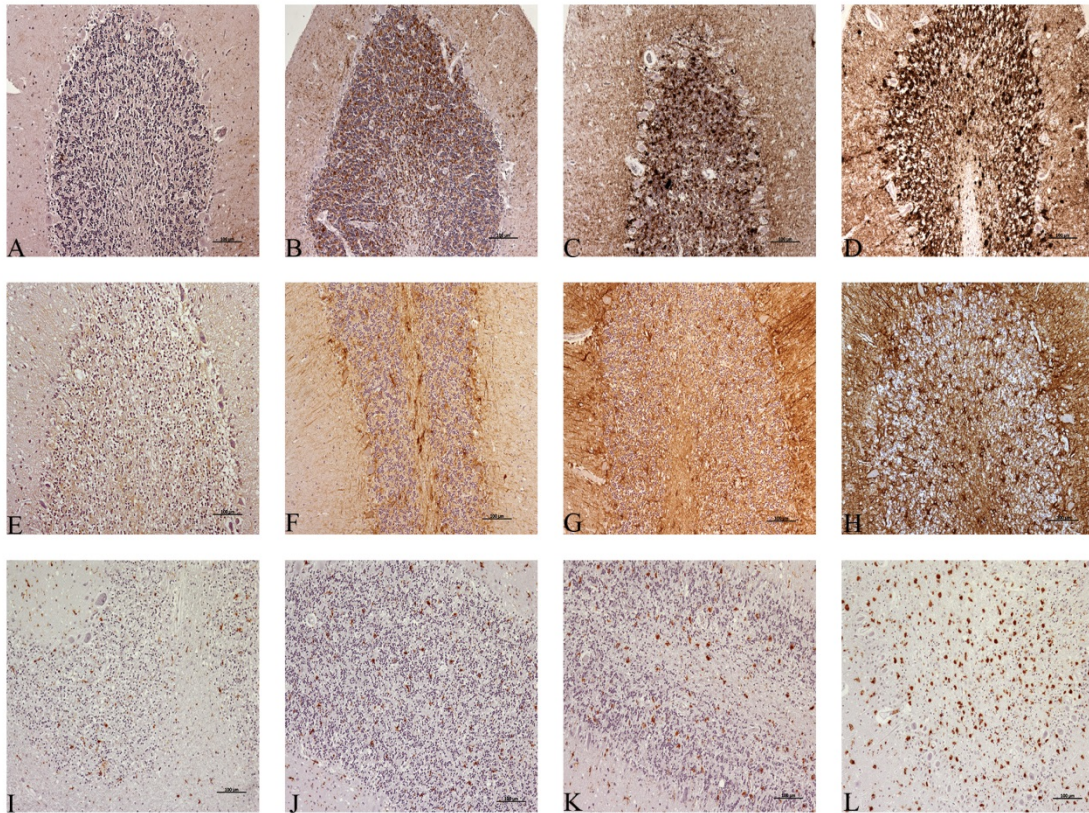


Figure 18.-The scoring system used after IHC protocols to evaluate the density and the extent of the labelled deposits (brown; hematoxylin counterstaining, blue) by light microscopy: from minimum to maximum, for PrP^{Sc} (A - D); GFAP (E - H); and reactive microglia (I - L). Scale bars: 100 μ m.

RESULTADOS

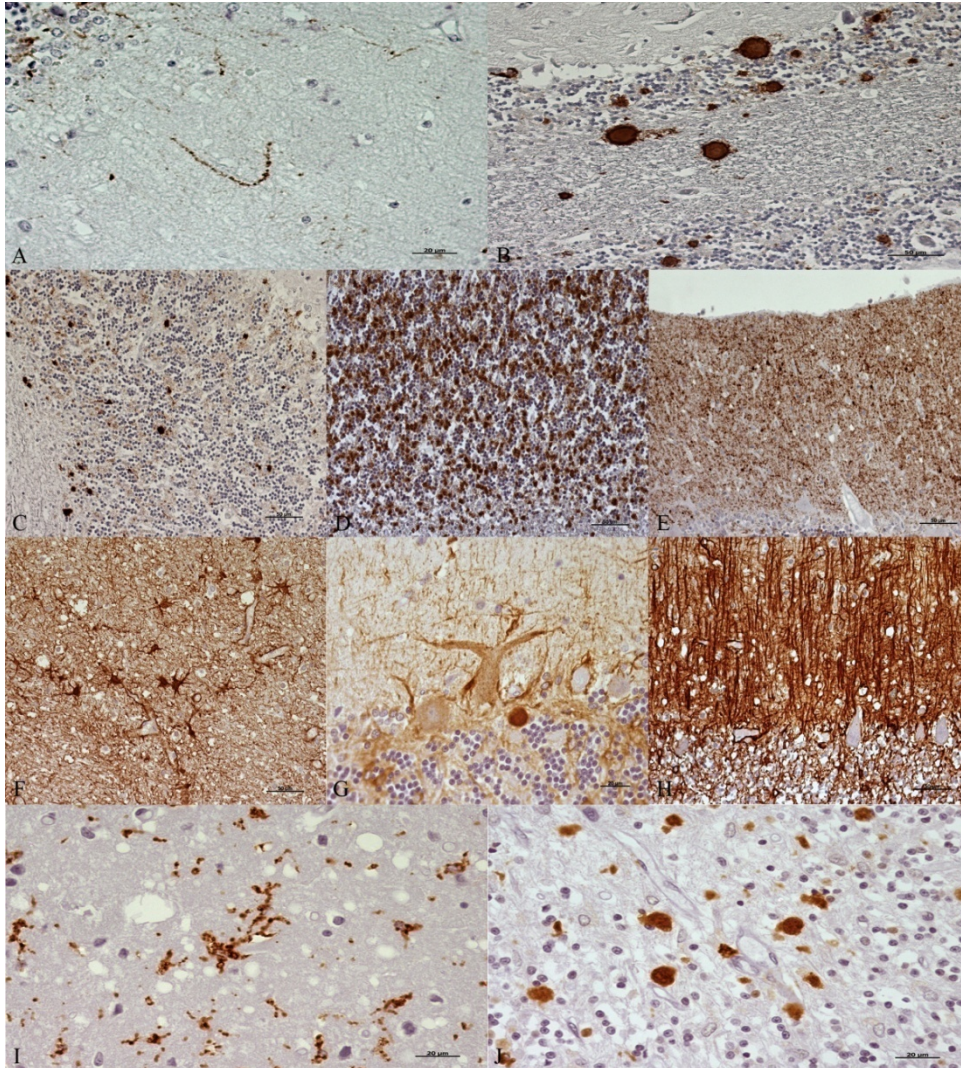


Figure 19.-Immunohistochemical patterns observed when each marker (brown; hematoxylin counterstaining, blue) was assessed. For PrP^{Sc}: A) linear, B) plaques, C) spots, D) coalescent, and E) granular. Scale bars: 20 μ m in A; 50 μ m in B - E. For GFAP: F) stellate, G) perineuronal, and H) radial. Scale bars: 50 μ m in F and H; 20 μ m in G. For reactive microglia: I) ramified and J) amoeboid. Scale bars: 20 μ m.

Immunohistochemical protocol for PrP^{Sc} detection by optical microscopy

It was necessary to include an epitope unmasking protocol, consisting of 96% formic acid immersion (5 min), digestion with proteinase K (5 min, RT; Life Technologies) and autoclaving in distilled water (10 min). After incubation with a primary antibody that recognizes prion protein (12F10 at 1/1700 dilution; SPI Bio, Darmstadt, Germany) for 1 h at RT, sections were incubated for 30 min at RT with EnVision™ mouse polymer (DAKO, Glostrup, Denmark), which was used as a visualization system.

RESULTADOS

Immunohistochemical protocol for GFAP detection by optical microscopy

After endogenous peroxidase blocking (H_2O_2 33%) for 5 min, sections were incubated with a primary antibody that specifically recognizes glial fibrillary acidic protein (GFAP 1/500, 30 min, RT; DAKO), as an astrocytic protein marker. Incubation with the labelled EnVision™ rabbit polymer (30 min, RT; DAKO) was performed.

Immunohistochemical protocol for reactive microglia detection by optical microscopy

Endogenous peroxidase blocking (H_2O_2 33%, 5 min), followed by incubation for 30 min at RT with MHC II (1/200; DAKO, Denmark) and CD68 (1/500; DAKO) primary antibodies, was used to immunolabel reactive microglial cells. EnVision™ polymer (mouse, 30 min, RT; DAKO) was used as a visualization system.

Immunohistochemical protocol for confocal microscopy studies

The protocol applied for co-location studies was based on a previously described version (Sarasa et al., 2012). Briefly, 50 μ m sections from fixed samples were collected in PBS (floating). Endogenous peroxidase blocking (H_2O_2 33%, 30 min) was followed by incubation with Triton X 100 (0.1% in PBS for 3 h, RT). Subsequently, incubation with the same specific antibodies, at the same concentrations as described above, was used to individually label reactive microglia and astrocytes (i.e., GFAP, MHC II and CD68, in PBS-Triton 0.1%). The secondary conjugated antibodies Alexa 488 (1/200; Invitrogen, Eugene - USA) and Alexa 594 (1/200, Invitrogen) were added in PBS for 1 h in the dark prior to assessment by confocal microscopy (Zeiss LSM 510).

The fluorescence emissions, with excitation from 488nm and 594nm lasers, was detected with a two-channel multi-track configuration, using bandpass 505 - 530 nm and long-pass 615-nm filters, respectively. Z-stacks of digital images were captured using Zen 2008 software (Carl Zeiss Microimaging, Germany) and collapsed into one resulting picture using the maximum intensity projection provided by the software.

RESULTADOS

6.1.4 Results

All samples corresponding to CJD patients showed spongiosis. Spongiosis intensity varied among samples, but it was similar in all layers within each cerebellum, except for two occasions. In one case, the highest intensity was found in the Purkinje cell layer and the lowest in the granular layer, and the opposite scores were found in the remaining case. Control samples did not show spongiosis in any cases (Table 4).

Table 4. Scores provided by light microscopy examination corresponding to each layer from each cerebellar sample for spongiosis after HE staining (according to the number of vacuoles: -, absence / +, very high number in grey matter) or immunolabelling for each specific marker used after IHC processing (by evaluating the density and the extension of the labelling deposits: -, negative / +, maximum).

Sample	Layers	Spongiosis	PrP ^{Sc}	GFAP	Reactive Microglia
CJD 1	Molecular	+++	+	+	+
	Purkinje cell	-	+	+	+
	Granular	++++	+	+	+
	White matter		-	++	++
CJD 2	Molecular	++	+	+	+
	Purkinje cell	++	+	++	+
	Granular	+++	++	+	+
	White matter		-	+++	+
CJD 3	Molecular	+	++	+	+
	Purkinje cell	++	+++	++	+
	Granular	++	++++	+	+
	White matter		++	+++	+++
CJD 4	Molecular	++++	++	++++	+
	Purkinje cell	++++	+	+++	+
	Granular	+++	+++	+++	+
	White matter		-	++++	+++
CJD 5	Molecular	+	+	+	++
	Purkinje cell	+++	+	++	+
	Granular	-	++	+	+
	White matter		-	+++	+
CJD 6	Molecular	+++	+	+	+++
	Purkinje cell	++	+	++	+
	Granular	++	+	+	+
	White matter		-	++	++
CJD 7	Molecular	+++	++	+++	+++
	Purkinje cell	++	+	+++	+
	Granular	++++	+++	++	+++
	White matter		-	+++	+
CJD 8	Molecular	+	+	+	+
	Purkinje cell	++++	++	++	+

RESULTADOS

	Granular	++++	+++	+	++
	White matter		+	+++	+++
CJD 9	Molecular	+++	++	+	+++
	Purkinje cell	++	+	++	+++
	Granular	++	+++	+	+++
	White matter		+	+++	+
CJD 10	Molecular	+	+	+	+
	Purkinje cell	++++	++++	++	+
	Granular	++	+++	+	+
	White matter		++++	+++	+++
CJD 11	Molecular	++++	++	+++	+++
	Purkinje cell	++	+	+++	+
	Granular	++++	+++	+++	+++
	White matter		-	++	++
CJD 12	Molecular	++++	++	++	++
	Purkinje cell	++++	+	++	+
	Granular	++++	+++	++	+
	White matter		-	++++	+
CJD 13	Molecular	+++	+++	+++	++++
	Purkinje cell	++	+	+++	+++
	Granular	+++	++++	++	+++
	White matter		+	+++	+
CJD 14	Molecular	+++	++	++	++
	Purkinje cell	++++	+	+++	+
	Granular	++++	+++	++	+
	White matter		-	+++	+
CJD 15	Molecular	+++	++	+	++
	Purkinje cell	++++	+	+	+
	Granular	++	+	+	+
	White matter		-	+++	++
CJD 16	Molecular	++++	++	+	++
	Purkinje cell	++++	+	+	+
	Granular	++++	++	+	+
	White matter		-	++	+
CJD 17	Molecular	+++	++	+++	++++
	Purkinje cell	++	+	+++	+
	Granular	+++	++	++	++++
	White matter		-	+++	++++
CJD 18	Molecular	++++	++	+++	+++
	Purkinje cell	++	+	+++	+++
	Granular	+++	+++	++	+++
	White matter		-	+++	+
CJD 19	Molecular	+++	+	+	+++
	Purkinje cell	++++	+	+	+
	Granular	++++	++	+	+
	White matter		-	++	+
CJD 20	Molecular	+++	+	+	+
	Purkinje cell	++	+	+	+
	Granular	+++	++	+	+
	White matter		-	++	+

RESULTADOS

CJD 21	Molecular	+++	+++	+++	++
	Purkinje cell	++++	+	+++	+
	Granular	++++	++++	++	+++
	White matter		+	+++	+++
CJD 22	Molecular	++++	+	-	+++
	Purkinje cell	++++	+	+	+
	Granular	++++	++	-	++
	White matter		-	++	++
CJD 23	Molecular	++++	+	++	++
	Purkinje cell	++++	+	++	+
	Granular	++	++	++	++
	White matter		-	+++	++
CJD 24	Molecular	+++	++	+	+++
	Purkinje cell	++++	+	++	+
	Granular	++	+++	+	+++
	White matter		-	+++	+
CJD 25	Molecular	+	+	+	+
	Purkinje cell	++++	+++	++	+
	Granular	+	+++	+	+
	White matter		+	+++	++
Control 1	Molecular	-	-	++	+
	Purkinje cell	-	-	++	+
	Granular	-	-	+	+
	White matter		-	+++	++
Control 2	Molecular	-	-	+	+
	Purkinje cell	-	-	+	+
	Granular	-	-	+	+
	White matter		-	+++	+
Control 3	Molecular	-	-	+	+
	Purkinje cell	-	-	+	+
	Granular	-	-	+	+
	White matter		-	+++	+
Control 4	Molecular	-	-	+	+
	Purkinje cell	-	-	++	+
	Granular	-	-	+	+
	White matter		-	+++	+
Control 5	Molecular	-	-	+	+
	Purkinje cell	-	-	+	+
	Granular	-	-	++	+
	White matter	-	-	+++	++

One control and three CJD cases presented the total degeneration of the granular layer.

In CJD cerebella, an evident decrease in nuclei count, as well as neurite thickening, was frequently observed in Purkinje cells. Furthermore, protein aggregates were clearly evident in the molecular and Purkinje cell layers by optical microscopic examination. Kuru plaques were exclusively found in one CJD patient (Figure 20).

RESULTADOS

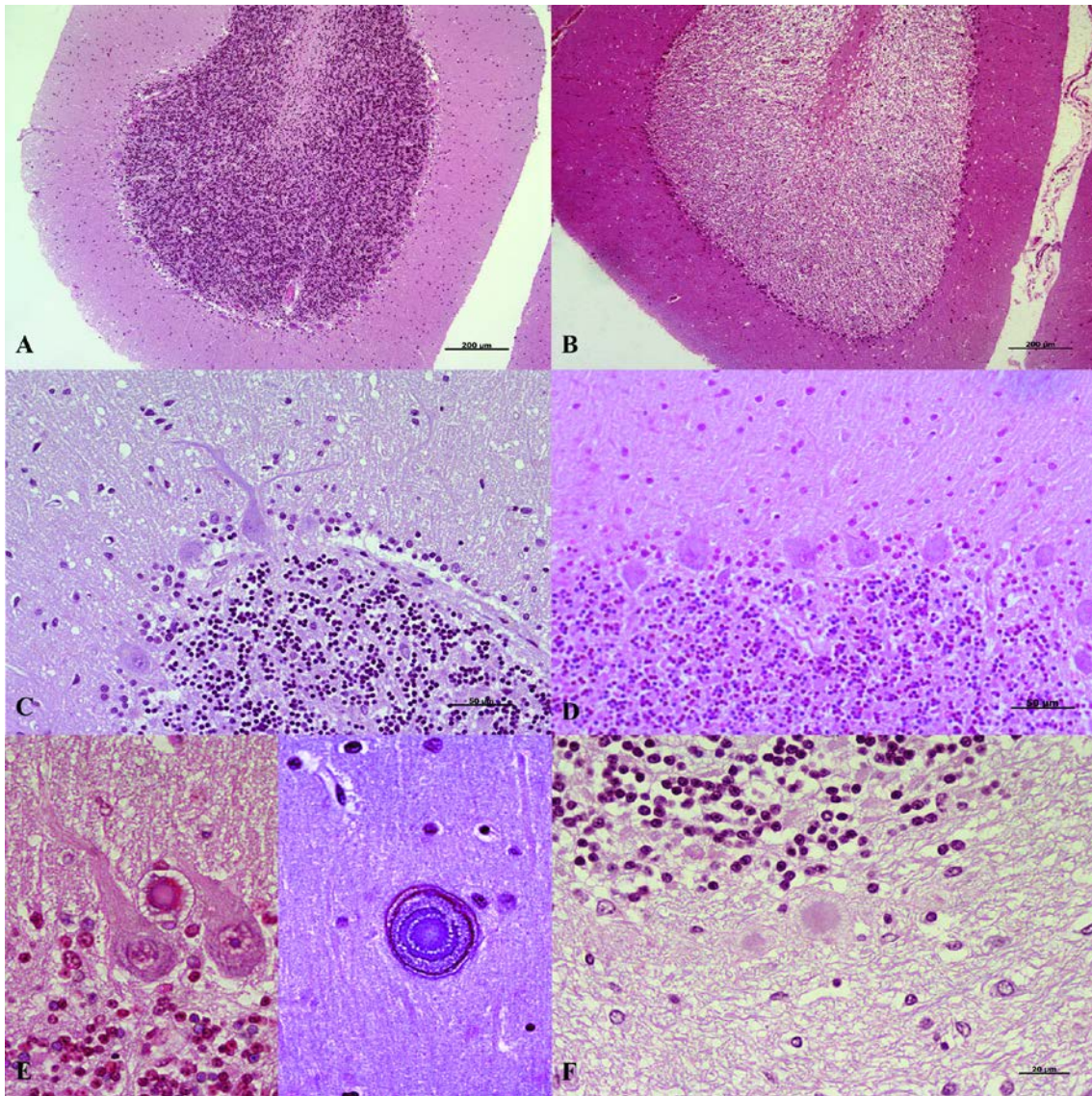


Figure 20.—Primary histopathological findings observed by light microscopic examination after H/E staining. A) Control samples did not show spongiosis in any cases. B) A total degeneration of the granular layer was found in one control, as illustrated, and in three CJD cases. C) An evident decrease in the nuclei count and neurite thickening were frequently observed in Purkinje cells from CJD compared with D) control cerebella. E) Protein aggregates were clearly evident in the Purkinje cell layer (on the left) and in the molecular layer (on the right) in several prion-affected cerebella. F) Kuru plaques were only found in the cerebellum from one CJD patient. Scale bars: 200 μm in A and B; 50 μm in C and D; 20 μm in E and F.

RESULTADOS

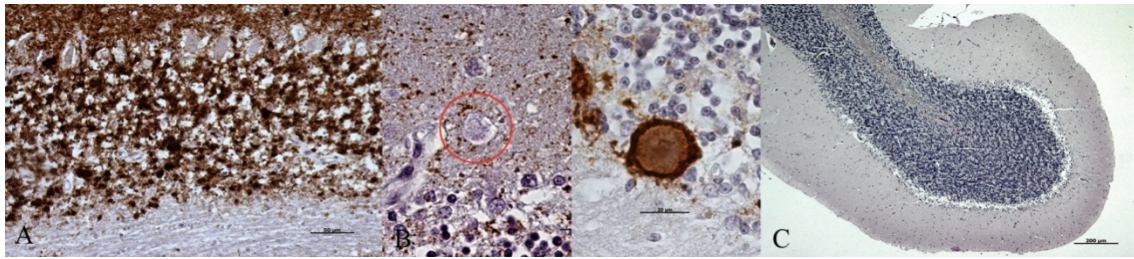


Figure 21.—Primary observations provided by light microscopic examination after the application of the IHC protocol for PrP^{Sc} detection (brown; hematoxylin counterstaining, blue). A) Purkinje cell layer and white matter from CJD cerebella always corresponded with the lowest intensity of protein deposit immunolabelling. B) Protein aggregates were not always associated with PrP^{Sc} immunostaining. C) PrP^{Sc} deposits were never observed in healthy controls. Scale bars: 50 μm in A; 20 μm in B; 200 μm in C.

A wide range of PrP^{Sc} deposit profiles was found in the cerebella from CJD patients, although granular and coalescent patterns were the most frequently observed patterns in the molecular and granular layers, respectively. The lowest intensity of protein deposit immunolabelling was detected in the Purkinje cell layer and in white matter. Specific immunostaining against PrP^{Sc} was not always present in protein aggregates. No PrP^{Sc} deposits were found in any control samples (Figure 21).

Samples from CJD patients showed an increase in GFAP immunostaining compared with healthy controls, which was especially evident in white matter. Specific astroglial immunostaining always appeared to be associated with protein aggregates, regardless of the presence of PrP^{Sc} deposition.

RESULTADOS

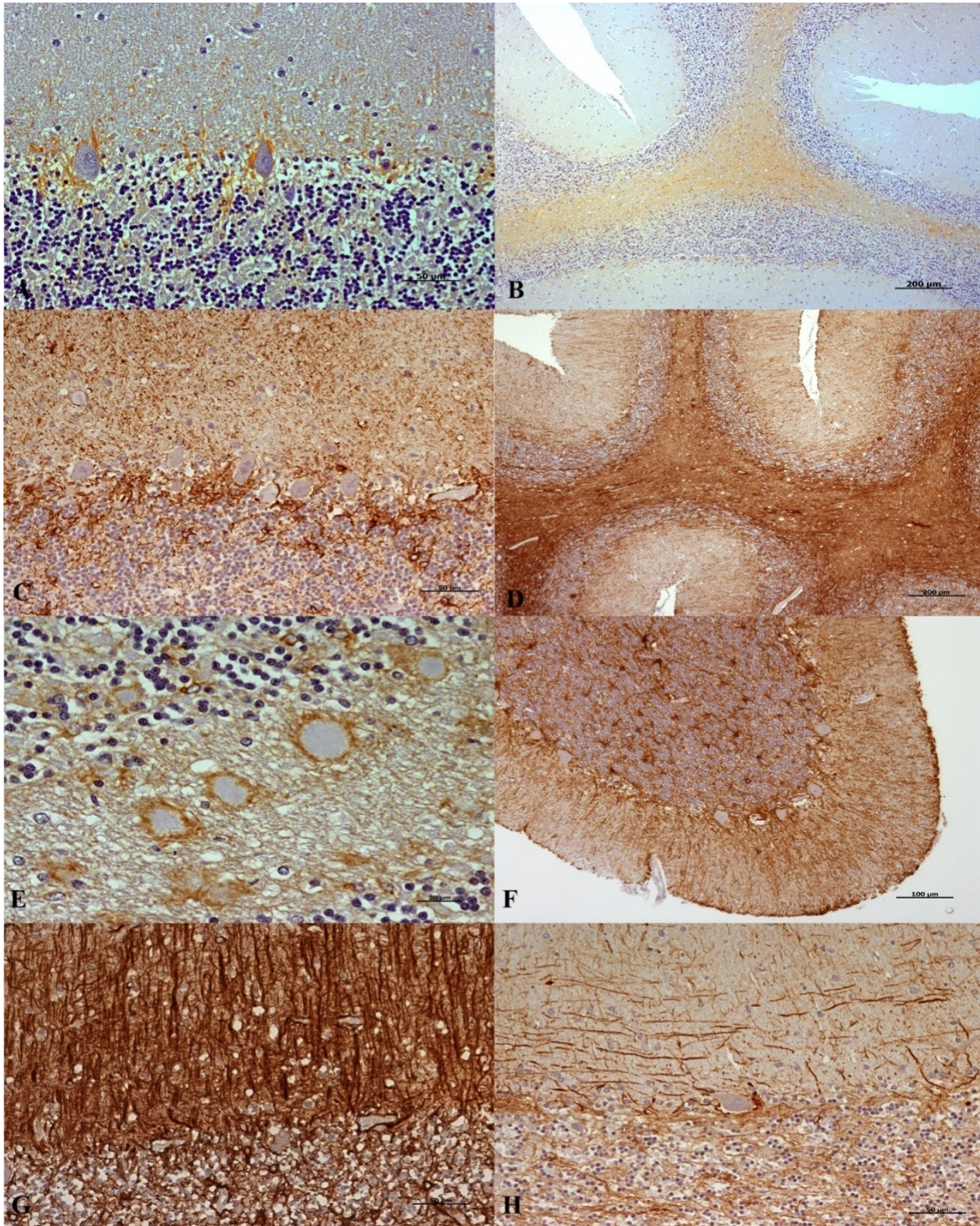


Figure 22.—Primary observations provided by light microscopic examination after the application of the IHC protocol for GFAP detection (brown; hematoxylin counterstaining, blue). A) The increase in GFAP immunostaining in CJD cerebellum was especially evident around Purkinje cells and B) white matter compared to those from healthy controls, C) and D), respectively. E) Protein aggregates always appeared associated with astroglial immunostaining. F) GFAP immunolabelling was evident next to the meninges in some CJD samples. G) An intense radial gliosis in the molecular layers was primarily found in CJD cerebella with higher GFAP intensity. H) Meanwhile, a large number of varicose fibers parallel to the pial surface were observed in CJD cerebella with lower GFAP intensity. Scale bars: 50 μm in A, C, G, and E; 200 μm in B and D; 20 μm in E; 100 μm in F.

RESULTADOS

Our previous findings regarding astroglial immunostaining in CJD samples (Garcés et al., 2016) were also confirmed here. An increase in the level of immunolabelling surrounding Purkinje cells and next to meninges was observed, and intense radial gliosis or large numbers of varicose fibers parallel to the pial surface were observed in the molecular layer from cerebella with higher or lower GFAP intensity, respectively (Figure 22).

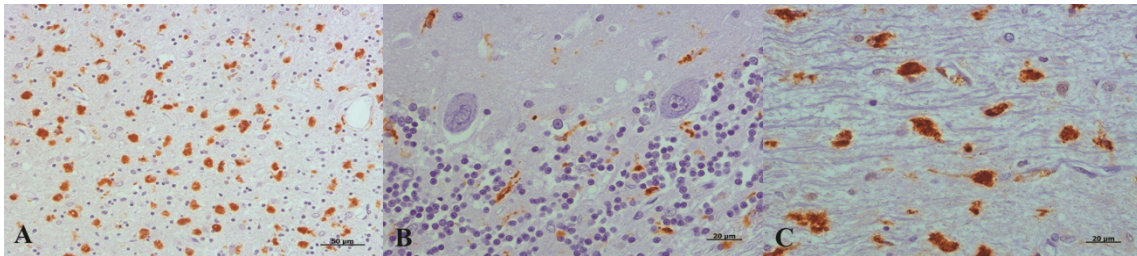


Figure 23.—Primary observations provided by light microscopic examination after application of the IHC protocol for reactive microglia detection (brown; hematoxylin counterstaining, blue). A) An amoeboid morphology was found in a degenerated granular layer. B) Purkinje cells were not found to be in close association with reactive microglia. Ramified morphology was primarily observed in this cell layer. C) Meanwhile, amoeboid shapes were more frequently found in white matter. Scale bars: 50 μm in A; 20 μm in B and C.

Immunolabelling corresponding to reactive microglia was found scattered over all examined areas in control cerebella. It primarily presented a ramified morphology, except for in the cerebellum that had a degenerated granular layer, where an amoeboid morphology was found. CJD samples demonstrated clear microglial reactivity, as the intensity of immunolabelling was higher in all affected cases compared to controls. Although the distribution of the microglial population (primarily located in white matter or in the molecular and/or granular layers) varied among CJD-affected cases, Purkinje cells were not found to be in a close relationship with this glial population. Moreover, a ramified morphology was primarily observed in the Purkinje cell layer. Immunostaining with amoeboid shapes was more frequently found in white matter (Figure 23).

RESULTADOS

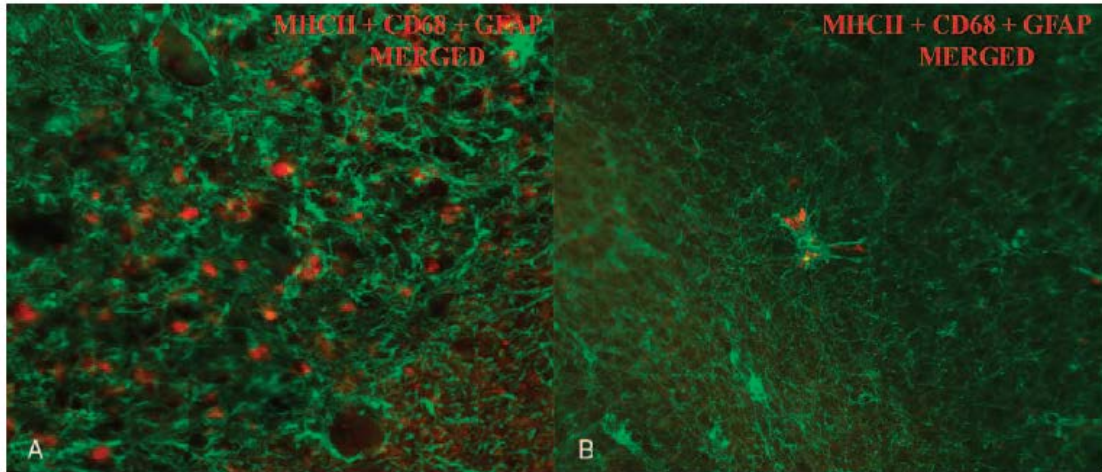


Figure 24.- Images obtained by confocal microscopy for the detection of both types of glial cells assessed in this study showed a more extensive interaction between microglia (red) and astroglia (green) in cerebella from A) CJD patients than in B) control patients (objectives: 10x, NA-03, capturing ROI and CROP scan).

6.1.5 Discussion

The function of the central nervous system has been long explained by a neurocentric vision, attributing all the primary information processing activities to neuronal cells. In recent years, several studies have challenged this concept, revealing that non-neuronal cell components, particularly glial cells, perform a dynamic range of functions that are essential for the physiology of the brain (Chung et al., 2015; Salter & Stevens, 2017). Thus, there is growing consensus that a more integrated level of neuroglial interactions needs to be considered to have a comprehensive overview of brain functions and dysfunctions. The observations presented here support the relevance of this interaction in the progression of neurodegeneration associated with prion diseases.

Glial activation had been assumed to be merely a response to pathophysiological events. However, recent data from preclinical and clinical studies have established that immune system-mediated actions contribute to and drive neurodegenerative disease pathogenesis.

Neuroinflammation has become a current hypothesis for the basis of neurodegeneration (Ransohoff, 2016).

The fact that microglia play multiple roles in prion diseases is well established. This glial population is assumed to play a major role in the pathological changes in these diseases (Brown, 2001). The present study assessed a number of CJD cases for reactive microglia in the brains of affected patients in comparison with controls. An increase in reactive

RESULTADOS

microglia has only been described in two cases in previous studies (Sasaki et al., 1993; Muhleisen et al., 1995). Based on animal models it has been suggested that microglial activation precedes neuronal loss (Baker et al., 2002; Borner et al., 2011). In addition, an inflammatory response mediated by microglia, astrocytes and cytokines in these diseases has been proposed to be an early event in the pathogenesis of disease and appears to remain activated for the duration of the disease (Van Everbroeck et al., 2002). These excessive inflammatory mediators could contribute to neuronal damage. Therefore, the results presented here support the idea that the inhibition of microglial over-activation could be a therapeutic strategy for alleviating microglia-mediated neuroinflammation.

Although the microglial response is thought to be more pronounced in the immature brain (Hoozemans et al., 2011; Umekawa et al., 2015) and in earlier stages of neurodegenerative disease (Hoozemans et al., 2005), the findings described here demonstrate that the capacity to process and/or maintain this response against specific stimuli remains, despite aging and disease progression.

It is known that activated microglia up-regulate many surface receptors, such as the major histocompatibility complex (MHC), or complement receptors, secreting a variety of soluble biologically active factors. The morphofunctional spectrum of microglia is highly regulated and is reflected by various intermediate states of activation. The malleability of phenotype appears to be the result of the very graded manner of glial cell response to changes in the environment (Graeber, 2010). There is an accepted distinction between phagocytosis by ramified and amoeboid microglia during basal conditions and neurodegeneration, respectively (Kettenmann, 2007; Sierra et al., 2010). However, the high phagocytic potential of unchallenged microglia may be even further enhanced during neurodegeneration (Tremblay et al., 2011), which could explain the observations of both phenotypes in the present study, as the antibodies which have been used here recognize immunological activity.

The loss of microglial integrity may also contribute to tissue pathology (Heppner et al., 2015). It is known that transformed microglial cells are indicative of a loss of tissue homeostasis. Phenotypically transformed microglia should consequently raise suspicions that intrinsic tasks are not being performed efficiently. The amoeboid pattern primarily observed in the white matter from CJD samples, in this study, could be explained by a loss of microglial functions and the consequent enhancement of disease conditions. A low accumulation of PrP^{Sc} aggregates was found in this layer.

RESULTADOS

Microglial activation is followed by astrocyte activation. Activated microglia can initiate and maintain astrogliosis. This suggests that the suppression of microglial over-activity might effectively attenuate reactive astrogliosis (Zhang et al., 2010). Prion disease pathogenesis entails altered astrocyte function, which may be considered an integral part of the neuroinflammatory response. The presence of activated astrocytes around PrP^{Sc} deposits is well documented in prion diseases (Brambilla et al., 2013). In agreement with the observations presented here, glial disorders should not be considered a late reaction to neuronal injury but rather as an intrinsic component of the pathological process. In fact, astrocytes not only form a glial scar in central nervous system diseases (Burda & Sofroniew, 2014), but their activation may occur early in the course of neurodegenerative pathogenesis. Because hypertrophy shown by this glial population eventually results in deficient glutamatergic transmission, they could possibly contribute to cognitive impairment (Olabarria et al., 2011).

With this study, a model of neuronal death in prion disease has emerged, indicating that both microglia and astrocytes can either induce or exacerbate neuronal death induced by the abnormal prion protein isoform. Despite some claims that the neurotoxic effect of PrP^{Sc} does not require the effects of glia, gliosis and astrogliosis, appear to be clearly involved in the deleterious mechanism of the toxic prion protein. Perhaps a combination of astroglial and microglial effects could explain the neuroinflammation hypothesis by mediating or exacerbating the toxic effects of protein accumulation in the brain. It had been demonstrated that astrocytes can also act on microglia, creating a paracrine and autocrine feedback loop, whereby microglia and astroglial derived factors regulate each other (Lotan & Schwartz, 1994; Saijo & Glass, 2011). As a consequence, gliosis would mediate neuronal death. Microglial impairment might paradoxically be sustained by inflammatory cytokines. This suggests that neuropathology could be accelerated through a negative feedback loop. Ultimately, prolonged microglia impairment would also be accompanied by a loss of trophic functions and the elimination of protective properties. *In vivo* Alzheimer's disease experiments have suggested that the coexistence of microglia and astroglia diminishes the ability of microglia to digest and degrade plaques (DeWitt et al., 1998). Therefore, activated astrocytes may exert a regulatory effect (negative feedback) on the phagocytic activity of microglia. The close relationship, demonstrated here by confocal studies, between astrocytes and microglia, combined with the increase in both activated glial populations, would support this cooperative action for neuronal damage.

In addition to microglia and astrocytes, other CNS resident cells, such as endothelial cells, can contribute to neuroinflammation. Endothelial cells, a key element of the neurovascular unit,

RESULTADOS

have been demonstrated to contribute to the entry of misfolded proteins into the brain in prion (Sarasa et al., 2012) and Alzheimer's disease models (Sagare et al., 2012). In this model, they have also been demonstrated to influence inflammation, due to mechanisms influencing the efflux of amyloid and neurotoxic species. Additionally, other proteins, such as growth factors and adhesion molecules, may enable the influx of immune cells into the brain (Grammas, 2011; Lyros et al., 2014).

In 2004, Marín-Teva et al. (Marin-Teva et al., 2004) demonstrated that microglia promoted the death of Purkinje cells in the developing mouse cerebellum. However, the limited detection of reactive microglia and, by contrast, the increased presence of astroglia in the Purkinje cell layer detected in this and previous (Garcés et al., 2016) studies, would suggest the relevant contribution or involvement of astroglia in this task.

With regards to this neuronal cell type, Purkinje cells are the dominant elements involved in the processing of cerebellar information (Apfel et al., 2002). The cerebellum controls motor coordination, balance, muscle tone, motor learning and cognition. These functions are partly mediated by neurons in the cerebellar cortex, which receive excitatory input from the somatosensory system and the cerebral cortex. These excitatory inputs are relayed by glutamatergic mossy fibers, originating in the brain stem and spinal cord. A single mossy fiber makes synaptic connections with hundreds of granule cells, and thousands of these cells provide excitatory input to Purkinje neurons. Inhibitory inputs are provided by the molecular layer interneurons and perhaps by Purkinje cells. In agreement with the histopathological findings observed here, the number of Purkinje cells in older animals has been shown to decrease throughout the cerebellar cortex (Sturrock, 1989), and Purkinje cells in older animals have been demonstrated to exhibit torpedoes (Baurle & Grusser-Cornehls, 1994). Moreover, defects have been described as secondary to Purkinje cell loss, including the significant loss of granule (Ghetti et al., 1978). It is difficult to determine whether Purkinje neuronal cell loss occurs in a random or orderly fashion, because cerebellar cell death is much more topographically complex than generally appreciated (Sarna & Hawkes, 2003). All these findings about Purkinje cells were similarly described in previous studies on Scrapie (prototype of prion disease), where these neurons were concluded to play a relevant role in neurodegeneration and were simultaneously the most damaged and protected cell type in the studied area (Hernandez et al., 2014; Sarasa et al., 2015).

RESULTADOS

In these previous morphological studies on Scrapie, a similar intense radial gliosis was observed as was observed in some of the CJD samples here, which corresponded with terminal stages of the disease. Meanwhile, those showing an increasing number of fibers parallel to the pial surface resembled non-terminal cases (a lesser progression of neurodegeneration). A similar astroglial pattern was also recently described in the cerebella of patients with Alzheimer's disease (Alvarez et al., 2015). Some authors point to specific novel glial cells as being good candidates for involvement in the pathogenesis of this neurodegenerative disease (Dzamba et al., 2016), based on their proliferative properties and the capacity for neuron and astrocyte regeneration (Elsayed & Magistretti, 2015). Both features result in increased interest in this cell type during neurodegeneration.

Understanding how glial response is triggered in association with protein accumulation under the pathological conditions characteristic of CJD may highlight novel targets for therapeutic intervention, not only for prion disease but also for prion-like disorders. In fact, several attempts to achieve therapeutic interventions have been recently published. One of these studies strongly supports the important contribution of microglia within the prion disease process, identifying the nature of the response through the gene expression analysis of isolated microglia (Vincenti et al., 2015). Our previous studies point to astroglial cells being involved in the pathogenesis of not only CJD but also of Alzheimer's disease (Garcés et al., 2016). The consistent relationship between both microglia and astroglia and protein aggregates, demonstrated in this morphological study, and constitutes an innovative contribution to understanding prion diseases. This relationship has also been suggested to be involved in various neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Parkinson's or Huntington's diseases, amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis (Liddel et al., 2017).

Finally, it would be relevant to emphasize the importance of studying human brain material to provide reliable results. It has become a common practice in Neurobiology, and in research in general, to extrapolate from experimental models to natural disorders. However, there are large differences between animal models and humans, and this is the likely reason why many conclusions drawn from studies performed on animal models fail to reflect actual mechanisms of disease. Unfortunately, these studies have certain limitations, which prevent the formation of broader conclusions. On many occasions, only partial data on patients are available, and the clinical history, dominant symptoms and even PrP genotype, are unknown.

In conclusion, proteinopathies, such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases, in which aberrant proteins spread throughout the brain during disease progression, may share a

RESULTADOS

molecular basis and mechanisms of propagation. Therefore, studies elucidating the interaction between gliosis and prion propagation are relevant to these other neurodegenerative diseases, by providing new targets for therapeutic intervention.

The observations presented here demonstrate the involvement of astroglial and microglial cells in all of the CJD cases studied and would support the current controversy about neuroinflammation as a cause of neurodegeneration.

RESULTADOS

6.2 MORPHOLOGICAL CHANGES OF GLIA IN PRION AND

A PRION-LIKE DISORDER

6.2.1 Abstract

Several neurodegenerative diseases such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's are considered to be prion-like disorders in that they are all proteinopathies where in aberrant proteins spread throughout the brain during disease progression, and thus they may share molecular basis and mechanisms of propagation. Therefore, studies elucidating mechanisms of prion propagation may be relevant to other neurodegenerative diseases. While substantial progress has been made, the pathogenesis of these neurodegenerative diseases is still largely unknown, and as consequence, to date no truly effective treatments that prevent onset or delay progression of these diseases have been identified. In addition to propagation of misfolded proteins, these diseases all induce a host response that includes activation of astrocytes and microglial cells. However, in our opinion, the glial response in each of these diseases has not been well-defined.

Since a role for glial response in prion disease has been clearly demonstrated in a previous study concerning Scrapie in sheep, a similar approach to analysis of astrocytic gliosis has been taken here for Creutzfeldt-Jakob (CJD) and Alzheimer's (AD) diseases. Here, morphological analysis of glial cells in cerebella from CJD and AD patients (as the most common prion and prion-like disorders, respectively) was performed.

The results presented in this study support the involvement of glial cells not only in the pathogenesis of CJD, but also of AD. A relationship between intensity and morphology is observed in astroglia from the molecular layer in both pathologies. By contrast, the involvement of microgliosis in AD-affected samples showed a lower relevance from that observed in CJD, since reactive microglia were much more abundant in prion disease.

Further analysis of the role of gliosis in CJD and AD, as well as other neurodegenerative diseases, may well advance knowledge of the mechanisms underlying these diseases and may also provide new targets for therapeutic intervention.

Keywords: Alzheimer's disease, Prion diseases, Glia, Creutzfeldt-Jakob disease.

RESULTADOS

6.2.2 Introduction

Current evidence supports the idea that many neurodegenerative diseases share specific features with prion diseases. Molecular mechanisms consisting of aggregation and spreading of misfolded proteins that are characteristic for each of them show similarities and, as a result, they have been included in a prion-like disease group (Fernandez-Borges et al., 2013). Stanley Prusiner, the first scientist to identify the unique characteristics of prion disease, has even applied the term 'prion' to the specific aberrant proteins in each of these diseases that are the pathological hallmark, including β -amyloid in Alzheimer's and α -synuclein in Parkinson's disease (Prusiner, 2012 and 2013). At microscopic level, all these disorders show histopathological insults such as amyloid deposits, neuronal loss, neurite degeneration and gliosis. The present study is particularly focused on contributing to knowledge concerning the latter – gliosis.

Astroglia were initially thought to simply support neurons. More recent research has demonstrated they are essential for correct functioning of the central nervous system (CNS). Astrocytes are a cooperative component with neurons in the physiology, metabolism and homeostasis. They play a critical role in establishment of the blood brain barrier (BBB), embryological CNS development, neurotransmission, and tripartite synapsis (Abbott et al., 2006; Iadecola & Nedergaard, 2007; Perea et al., 2009; Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010; Barry et al., 2014). The other glial cell type, microglia are the main immune cells in CNS (Streit & Kincaid-Colton, 1995; Graeber & Streit, 2010). In response to any CNS injury, a glial multicellular response is detectable (Burda & Sofroniew, 2014). Specifically in regards to neurodegenerative disease, an association between reactive astroglia and / or microglia with aberrant protein deposits has been described (Beach et al., 1989; Itagaki et al., 1989; Diedrich et al., 1991; Sikorska et al., 2009). However, in our opinion, the role of these cellular populations in the neurodegenerative process has not been sufficiently elucidated. Astroglial and microglial subpopulations may have dual roles in the neurodegenerative disorders, exerting both neuroprotective and neurotoxic effects in CNS (Ekdahl et al., 2009; Sofroniew, 2009; Graeber & Streit, 2010).

The present study was initiated as a result of our interesting findings concerning involvement of glial cells in neurodegeneration in sheep affected with Scrapie, a natural prion disorder. The main aim of the study here was to compare and contrast morphological alterations of glial cells in cerebella from Creutzfeldt-Jakob disease (CJD, as the most common prion disorder) and

RESULTADOS

Alzheimer's disease (AD, as the most common prion-like disorder) as revealed by immunohistochemical labeling with specific markers for astrocytes and microglia.

6.2.3 Materials and Methods

Samples

This study was performed on sagittal sections of cerebellar samples from 10 CJD (Spanish brain banks from *Hospital Universitario Fundación Alcorcón*, Madrid) and 10 AD (*Hospital Universitario Gregorio Marañón* or *Psiquiátrico de Ciempozuelos* from Madrid) patients. All cerebellar sections included a representative area from molecular, Purkinje cell and granular layers, and white matter. All tissues were all formalin-fixed, formic acid inactivated for 1 hour, paraffin embedded, sectioned at 4 - 5 μm , and mounted on Vectabond pre-treated glass slides. The immunohistochemical protocols, as follows, were then performed on tissue sections after overnight incubation at 56 °C and deparaffinization through graded alcohols.

GFAP immunohistochemistry

After endogenous peroxidase inactivation by incubation of sections with peroxidase blocking reagent (DAKO, Hamburg, Germany) for 5 min, sections were incubated with a monoclonal primary antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/500, 30 min RT; DAKO, Hamburg, Germany) followed by incubation with enzyme-conjugated polymer Envision™ - labeled rabbit secondary antibody (30 min, RT; DAKO Hamburg, Germany). Labeling was performed using DAB PLUS (10 min) as chromogen.

Morphology and intensity (high, medium, or low) of GFAP immunostaining were assessed in each layer from all the cerebella.

Reactive microglia immunohistochemistry

For reactive microglia labeling, the protocol was the same as that for GFAP, but CD68 and MHCII primary antibodies were used (1/500 and 1/200, respectively; DAKO Hamburg, Germany) and the incubation was 30 min at RT.

Morphology and intensity (high, medium, or low) of reactive microglia immunostaining were assessed in each layer from all the cerebella.

RESULTADOS

6.2.4 Results

GFAP immunostaining

While the focus of this study was morphology, the intensity of GFAP immunostaining for the AD and CJD samples was also classified as described above: high, medium, or low intensity. The following astrocytic morphologies were consistently observed in samples from both CJD and AD patients, and consisted of three main findings: first, GFAP immunolabeling was increased around Purkinje cells (Figure 25); second, fibrillar labeling in the molecular layer corresponding to radial (Bergmann) glial labeling, and third, a horizontal astroglial profile. The radial glia labeling was found in those samples with high GFAP intensity and, conversely, the horizontal glia labeling in those with a low GFAP intensity (Figure 26).

GFAP immunolabeling was consistently detected in association with protein aggregates in both, AD and CJD tissues (Figure 27). Also in both CJD and AD tissue, GFAP immunolabeling appeared next to the meninges in many occasions (Figure 28).

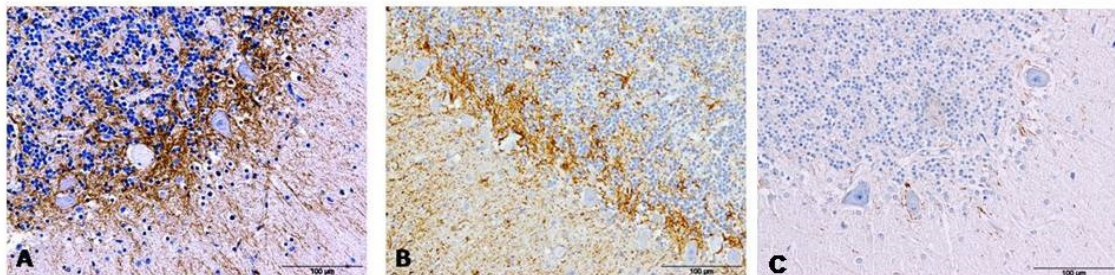


Figure25.-GFAP detection by immunohistochemistry in cerebella from AD (A), CJD (B) and control (C) cases show an evident increase of immunolabeling around Purkinje cells

RESULTADOS

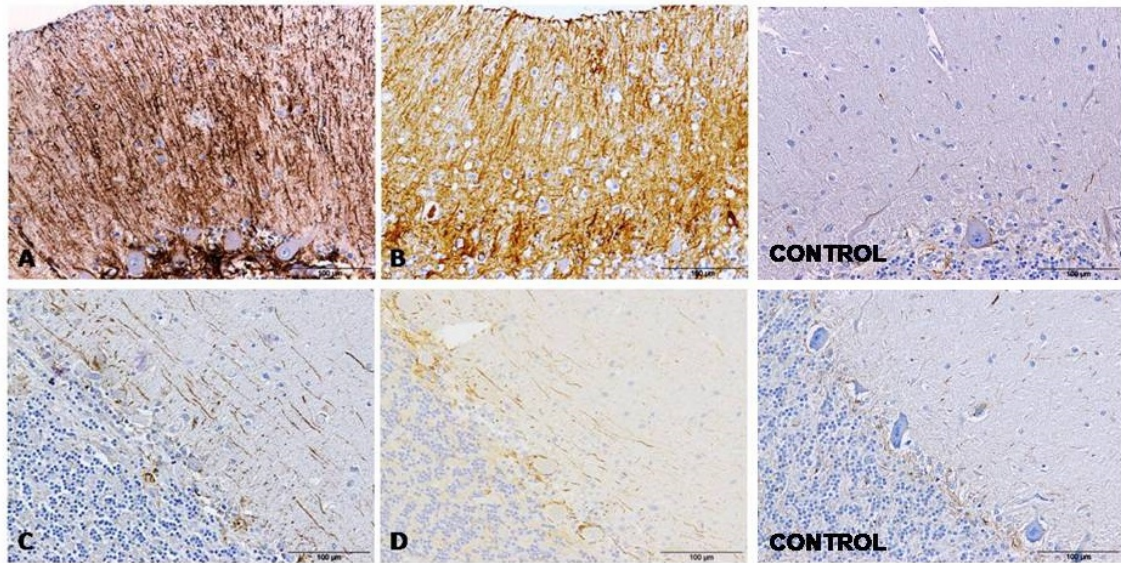


Figure26.-GFAP immunolabelling in cerebella evidenced two different astroglial profiles in the molecular layer from samples affected by both pathologies, AD (A and C) and CJD (B and D), respectively: a radial profile when high GFAP intensity (A and B) or a horizontal profile when lower GFAP intensity were detected (C and D). GFAP immunolabelling in cerebella from control cases are also showed.

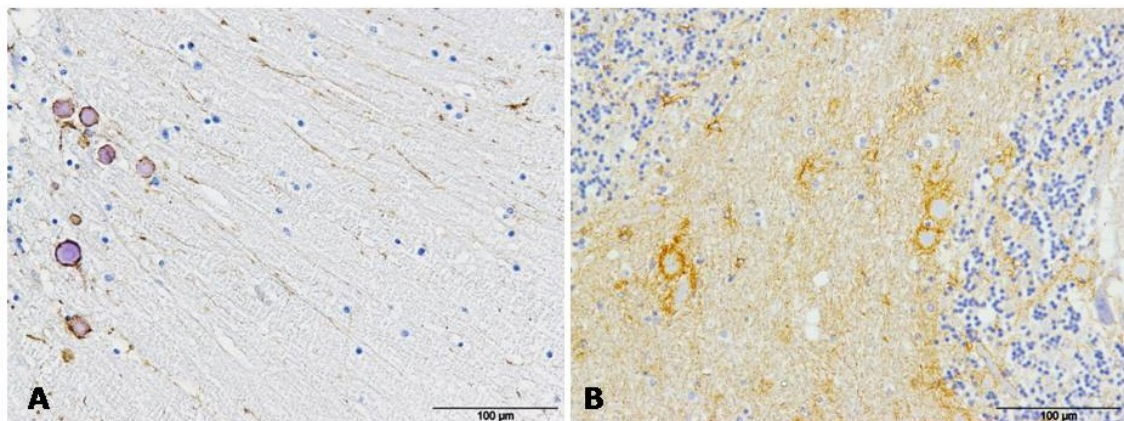


Figure27.-GFAP immunolabeling was always detected in association with protein aggregates in AD (A) and CJD samples(B)

RESULTADOS

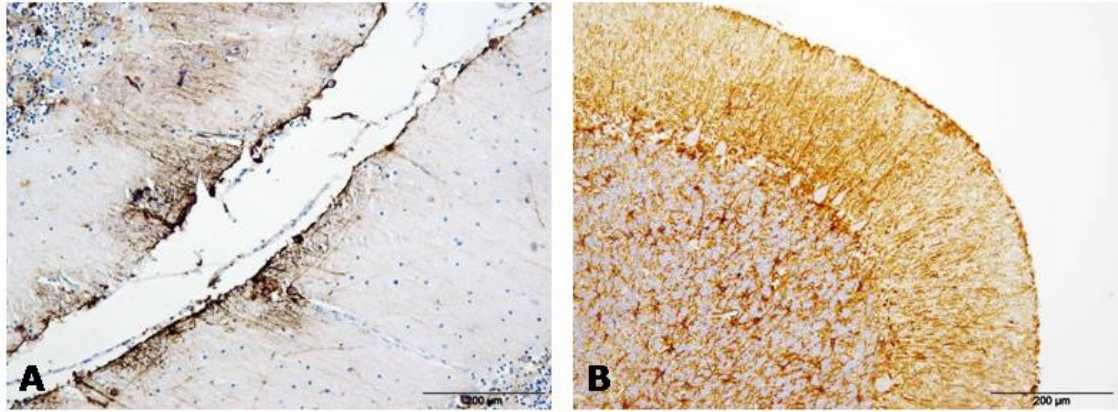


Figure28.-GFAP immunostaining appeared next to meninges in AD (A) and CJD (B) cerebella in many occasions.

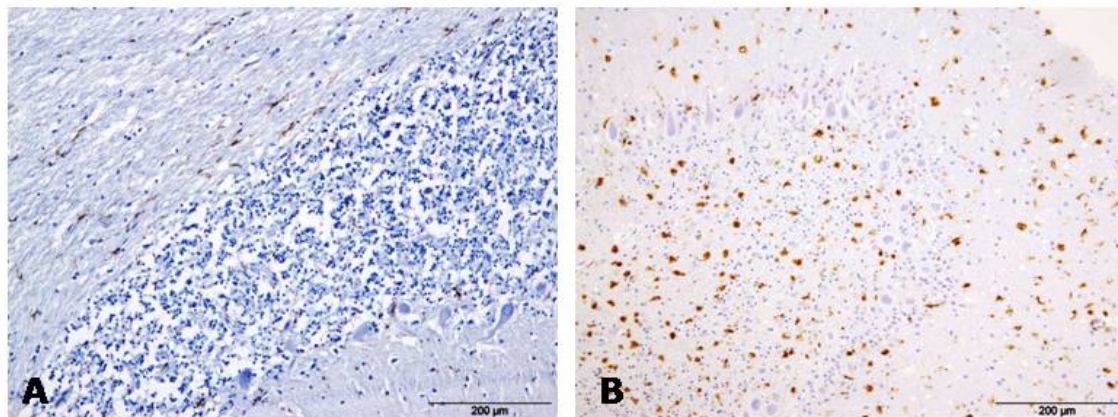


Figure29.- Reactive microglia immunostaining in cerebellum differs depending on the pathology studied:scarce, mostly ramified and located in white matter from AD samples (A); or abundant, combined ramified -amoeboid and extended over all the layers from CJD patients (B).

Reactive microglia immunostaining

Both ramified and amoeboid activated microglia was detected in all cerebellar layers from all CJD samples. In contrast, little microglia activation was seen in AD tissues. Only in two AD samples was some microgliosis detected, and it was mostly limited to white matter and presenting ramified morphology (Figure 29).

RESULTADOS

6.2.5 Discussion

Both astrogliosis and microglial activation consistently appear in brain tissue from patients suffering from neurodegenerative disease (Sofroniew, 2009; Sofroniew & Vinters, 2010; Burda & Sofroniew, 2014). Despite constituting a universal finding across many neurodegenerative diseases, there has not been the focus on this response that is afforded the proteins that are implicated in each disease. The present study constitutes a preliminary approach to determine whether glial changes observed in a human prion disease, CJD, agree with those observed in the most prevalent prion-like disease, AD. To our knowledge, this is the first morphological study performed with the aim to compare the specific alterations of glial cells in these two neurodegenerative diseases. We focused on microglia and astroglia, due to their roles in immune function and therefore, in neuroinflammation. Neuroinflammation itself is considered either causative or contributory to the pathogenesis of neurodegeneration (Bonifati & Kishore, 2007; Sofroniew, 2009).

Cerebellum is a brain area affected in all CJD patients, but in AD patient involvement of this area is less evident. However, results presented here indicate that astroglia show similar morphological changes in cerebellum from patients suffering either pathology. Labeling around Purkinje cells had been seen previously in Scrapie-affected sheep (Hernandez et al., 2014) and is seen again here in both CJD and AD. In cerebella from AD affected patients, neuronal loss and astrogliosis has previously been assessed, but in that study only familial and sporadic Alzheimer's disease were compared (Fukutani et al., 1996). The demonstration here that Purkinje cells are the most 'protected' neurons has been evidenced by ultrastructural studies in Scrapie, where they were revealed to be the most damaged neurons too. Vacuolation preferentially occurred around these neurons (Sarasa et al., 2015). This finding indicates that the normally protective role of astrocytes may become deleterious in advanced disease.

Similar findings pointing to Purkinje neurons as playing a role have been reported for Guam disease or Amyotrophic lateral sclerosis / Parkinsonism-dementia complex (Sebeo et al., 2004). As a whole, Purkinje cells appear to constitute one main target of neurodegeneration, not only in prion but also in prion-like diseases. Further studies focused on the interaction between this neuronal population and astroglia are being currently undertaken in order to elucidate this finding. Astrocytic ability to protect but also damage neurons might explain that the neurodegenerative progress is found closely associated to these glial cells.

RESULTADOS

Another notable observation here consists of the relationship between intensity and morphology observed in astroglia from the molecular layer. The intense radial gliosis observed in samples showing higher GFAP intensity suggests an advanced stage of the disease in agreement with conclusions provided in the Scrapie model (Hernandez et al., 2014). Those samples showing a lower GFAP intensity showed a decrease of radial morphology while a different horizontal morphology appeared instead; they could correspond to an earlier stage of the disease based on the observations described in the study developed in the Scrapie model cited above. Cerebellar radial glia are used as 'scaffolds' guiding neuroprogenitor cells during development. This could suggest a glial stem cell response with the aim of compensating for neuronal loss, as previously proposed (Barry et al., 2014) on the basis of the evidence of that radial glial cells are important progenitor cells that contribute to gliogenesis. Furthermore, the relevance of studies developed in prion naturally affected animals is confirmed here as a reliable tool for helping to understand observations in affected human samples. Unlike in human disease, studies of Scrapie in sheep allow variables to be controlled and disease progress defined; the results of these studies may be extrapolated and provide useful information in regard to human disease. This association would predict what is happening in the neurodegenerative process affecting humans.

By contrast, the involvement of microgliosis in AD affected samples differed greatly from that observed in CJD. Microglial activation appears to be less relevant in cerebellar tissue in AD than in CJD since reactive microglia were much more abundant in prion disease. However, other studies have indicated a higher significance for the role of microglia in AD. This could be explained due to the brain area studied or to the close relationship of this glial population with misfolded protein deposits or plaque-associated phagocytic activity, in prion disease (Sikorska et al., 2009) as well as in AD (Morgan, 2009). Thus, microglial activation is likely of greater significance in areas of brain wherein protein aggregates are found in AD, such as the hippocampus and cortex. Additional studies focused on further brain areas are planned in order to confirm this hypothesis.

The aggregation and spreading of aberrant proteins in prion and prion-like disease triggers a glial response. This glial response may itself impact the onset, progression, and severity of disease. To fully reveal the pathogenesis of prion and prion-like disease, there should be continued focus on both the astrocytic and microglial response to disease.

**6.3 SIMILAR PATTERNS OF ACTIVATED NEUROGLIA ARE SHARED BY
PRION AND PRION-LIKE DISORDERS**

6.3.1 Abstract

Neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's and Parkinson's, are considered prion-like disorders because they are all proteinopathies in which aberrant proteins spread throughout the brain during disease progression. The overall aim of this study is to determine how glial cells are commonly involved in the neurodegeneration progress observed in all these pathologies. The suggestion that they are cell types in which prion diseases and prion-like disorders have common behaviour is the hypothesis on which this study is based.

Morphological and distribution differences in astroglial and microglial cells in the cerebellum from prion and prion-like disease-affected patients were assessed here by histopathological and immunochemical tools.

To our knowledge, this is the first study to focus on the comparative assessment of glial profiles in these human brains. A higher involvement of the activated microglial population in prion diseases than in prion-like disorders and an evident increase in astroglial activation with specific patterns shared by cerebella from all disorders studied were the main findings described here.

Neuro-protective strategies for these disabling disorders with unavoidably lethal outcome are particularly. Astroglia might become a potential candidate for these therapeutic aims.

Keywords: Prion diseases, prion-like disorders, astroglia, microglia, neuroinflammation

6.3.2 Introduction

Currently, the association between neurodegenerative processes and neuroinflammation is undeniable. The presence of reactive microglia, release of cytokines, alteration of the blood brain barrier (BBB) and even neuronal death are hallmark elements belonging to the neuroinflammation hypothesis (Estes & McAllister, 2014). This neuroinflammation always appears to be associated with neurodegenerative diseases without the presence of external immune cell infiltration (Estes & McAllister, 2014; Filiou et al., 2014; Crotti & Glass, 2015). All of these features are directly or indirectly related to glia, giving this cell population a key role in the neurodegenerative process (Pasqualetti et al., 2015; Ransohoff, 2016). The glial population includes several heterogeneous cell populations. Based on their links to the immune response, studies regarding this hypothesis have mainly focused on microglia and astroglia.

As the main immune cell of the central nervous system, microglia are considered a critical player in neuroinflammation, and their activated phenotype is a specific marker of neurodegeneration. On the other hand, astroglial cells support the cells that form the BBB, establish close contact with neurons and play a regulatory role with microglia. Their activation is always observed in neurodegenerative tissues, and recent works have associated it with neurotoxicity (Ransohoff, 2016). However, the role of astrocytes in neuroinflammation is often understated (Jiang & Cadenas, 2014).

Currently, some authors suggest that several neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease, frontotemporal dementia and amyotrophic lateral sclerosis, should be grouped together. They present molecular mechanisms of specific protein aggregation and spreading similar to those demonstrated for aberrant prion proteins. As this is typical of the pathological proteins found in prion diseases, they are all included in the same cluster called prion-like disorders (Prusiner, 2013). All of them have fatal outcomes. Palliative or medical treatments have been evaluated during recent decades without conclusive results. Therefore, there is an evident lack of knowledge of the pathogenesis of these brain disorders (Prusiner, 2012; Fernandez-Borges et al., 2013; DiSabato et al., 2016).

As gliosis is broadly known as a chronic insult found in the brains of patients affected by proteinopathies, by focusing on glial populations, neurological progress may be more fully understood. The purpose would be to finally find a therapeutic target.

Efforts that have begun with this aim using natural Scrapie as a model of prion disorders have provided very interesting findings. A close relationship between astroglial cells and the neuropathological features associated with prion diseases was evident. An indisputable

RESULTADOS

involvement of astrocytes in prion progression was also demonstrated (Sarasa et al., 2012; Hernandez et al., 2014). Based on these outstanding findings, the present study presents a novel morphological approach that suggests glia as a cell type with similar behaviour in prion diseases and prion-like disorders.

The specific objective of this study is to compare the astroglial and reactive microglial profiles present in cerebellar sections from patients affected by prion and prion-like diseases to more fully understand the potential role of glia in the neurodegenerative process characteristic of all these pathologies.

The cerebellum is not the primary damaged region in most of these disorders because each one has been mainly associated with other brain regions. However, it has been selected on the basis of previous studies developed in Scrapie with comparative purposes. It is also important to consider that pathologies examined here affect the whole central nervous system (Sjobeck & Englund, 2001; Sebeo et al., 2004; Mirdamadi, 2016). Moreover, this region is certainly prone to injuries based on anatomical and physiological basis (Sarna & Hawkes, 2003). It also seems to be a reference point to detect neuroinflammation (Lyoo et al., 2015).

6.3.3 Materials and Methods

Samples

The present study was performed on samples provided by several banks from the UK brain tissue network following the national legislation guidelines on this matter. The samples came from the Centre for Clinical Brain Sciences, University of Edinburgh (cases affected by Creutzfeldt-Jakob disease, CJD, Alzheimer's disease, AD and motor neuron disease, MND), Centre for Neuroscience, Parkinson's UK Brain Bank (cases affected by Parkinson's disease, PD) and the Institute of Psychiatry, London Neurodegenerative Diseases Brain Bank (cases affected by Huntington's disease, HD and frontotemporal dementia, FTD). Additional samples were used as non-dementia controls.

A total of 21 fixed sections corresponding to cerebellar sagittal samples at the vermal level, including Purkinje cells, granular and molecular layers and white matter, were studied. They corresponded to three different affected cases from each of the pathologies at the final stage.

RESULTADOS

Methodology

Three - five millimetre slices from each individual were paraffin-embedded, from which 5 µm were sectioned and histologically (haematoxylin - eosin staining, H/E) or histochemically processed after formic acid treatment for prion inactivation (1 h) on all occasions.

After HE staining, all samples were assessed by light microscopy to identify neuropathological lesions.

GFAP immunolabelling

After endogenous peroxidase inactivation by incubation of these sections with peroxidase blocking reagent (5 min; DAKO, Hamburg, Germany), the sections were incubated with a primary antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/500 for 30 min RT; DAKO), followed by an incubation with enzyme-conjugated polymer Envision™ (30 min, RT; DAKO). Then, DAB PLUS (10 min) was used as the chromogen. Sections were counter-stained with haematoxylin.

Reactive microglia detection

The protocol used for reactive microglia labelling was the same as that applied for GFAP, with the exception of the primary antibody. In this case, CD68 (1/500, 30 min RT; DAKO) and MHCII (1/200, 30 min RT; DAKO) were used.

Light microscopy examination

Both GFAP- and reactive microglia-immunolabelled sections were thoroughly assessed in each cerebellar layer for morphology and distribution variations in the labelling. After immunohistochemical processing, all marker immunostaining was scored from negative (-) to maximum (+++++) by evaluating the density and the extension of the labelling deposits by light microscopy in each layer from each cerebellum.

RESULTADOS

Statistical analysis

Rating data were entered into an Excel spreadsheet and analysed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software (version 22.0).

The Kruskal-Wallis test was performed for analysis. As significant differences between the groups were detected, *post hoc* testing was performed to identify the groups with respect to controls which significant differences existed (Scheffe).

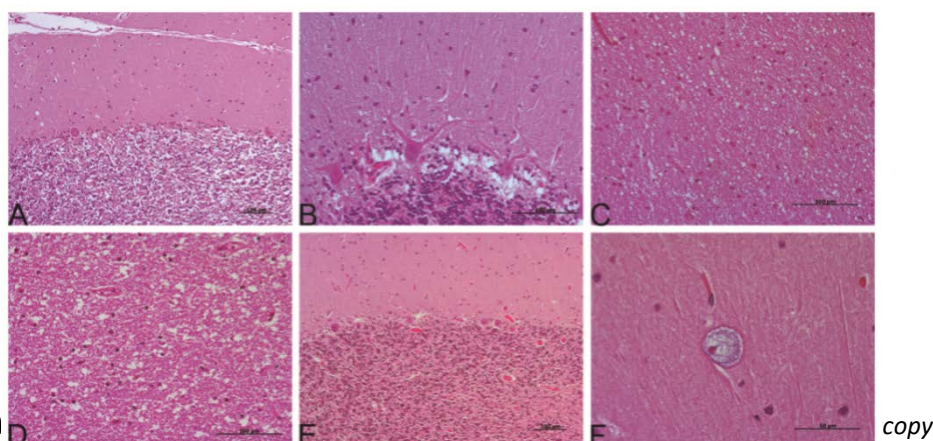
6.3.4 Results

The main findings observed by histopathological examination are described below.

Degeneration of the granular layer was found in three of the cases studied (from MND, FTD and control patients, respectively; Figure 30).

Moderate or severe tissue damage of the Purkinje cell layer and swelling of their neurites were very often observed (Figure 30).

Spongiosis always appeared in the CJD cerebella (Figure 30). Moreover, this histopathological lesion could also be observed in some prion-like samples (although presenting a more irregular morphology, distinguishable from that typically present in CJD cases; Figure 30). Meanwhile, the control samples did not show vacuolation (Figure 30).



(haematoxylin - eosin staining, HE) (A) Granular layer degeneration was observed in some cases, as shown here in a Frontotemporal dementia (FTD) specimen. (B) Decrease and swelling of Purkinje cells were very often observed, as shown in a Parkinson's disease (PD) specimen. (C) Typical vacuolation associated with prion disease is evidenced in a Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) specimen. (D) Vacuolation presenting an irregular morphology distinguishable from that typically found in CJD is shown in an FTD specimen. (E) No vacuolation was found in the control specimen. (F) Protein aggregates found in the molecular layer from a PD specimen.

RESULTADOS

Most samples showed protein aggregates mainly in the molecular and Purkinje layers but also in granular layers (the latter at a lower frequency).

An outstanding and constant finding consisted of astroglial immunostaining detected in intimate association with protein deposits on all occasions (Figure 31).

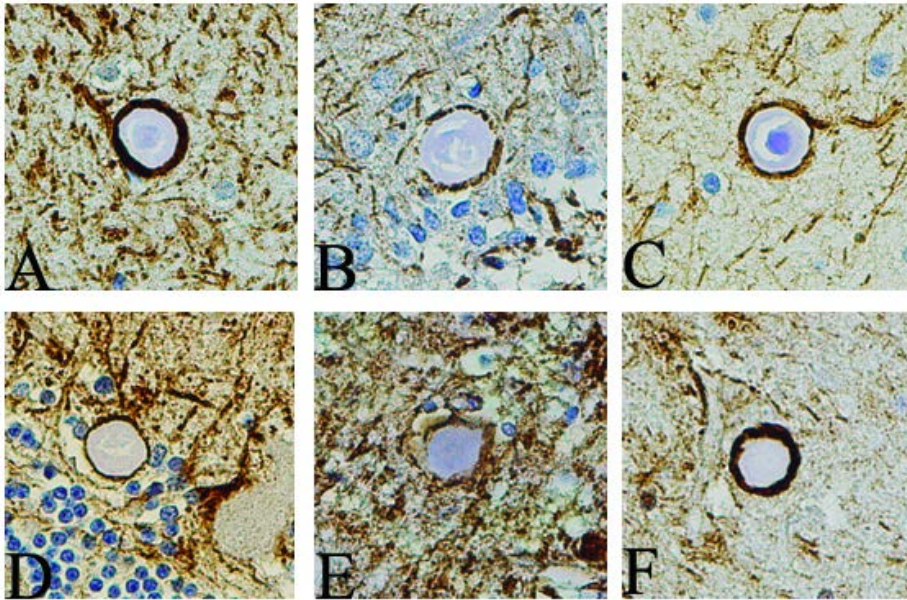


Figure31.- Astroglial immunostaining was always detected surrounding protein aggregates in Purkinje cells or molecular layers from (A) Alzheimer's disease, AD, (B) PD, (C) Huntington's disease, HD, (D) FTD, (E) Motor neuron disease, MND and (F) CJD-affected cerebella.

RESULTADOS

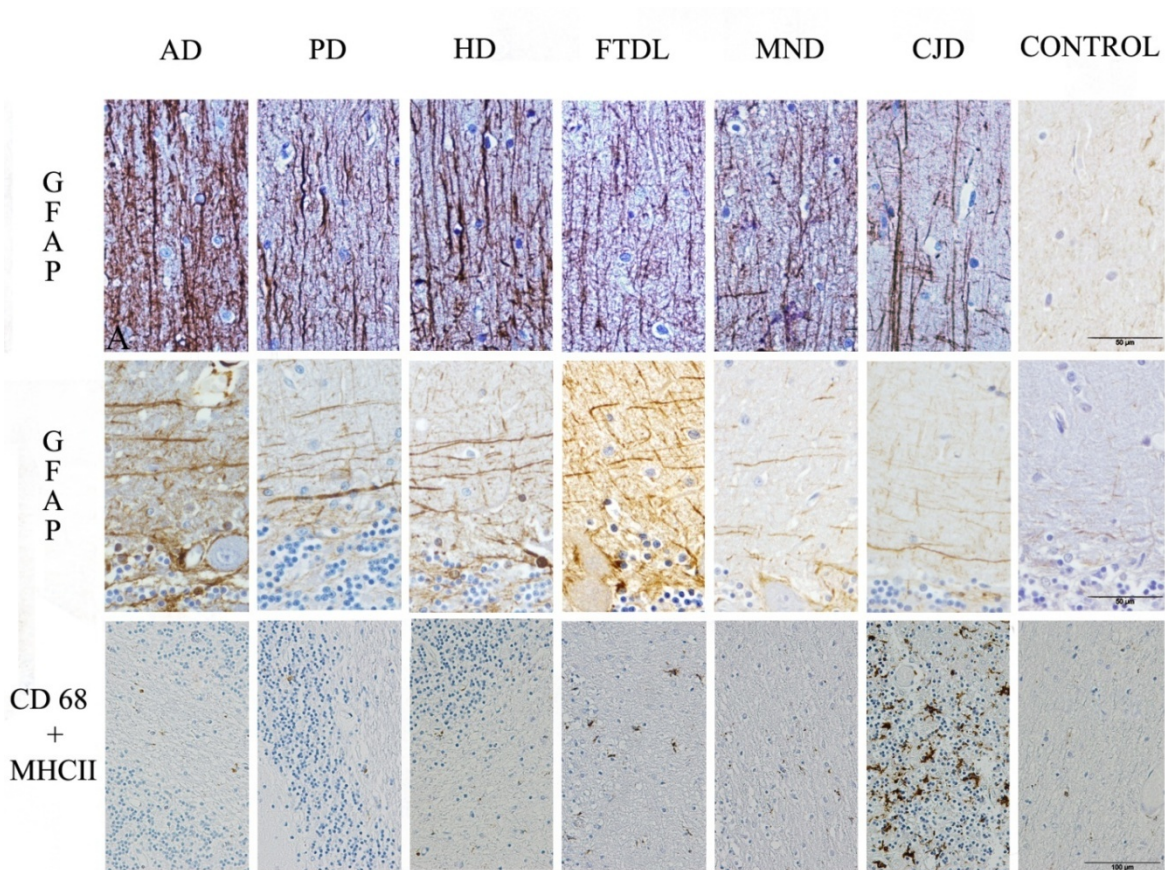


Figure 32.- Immunohistochemical pattern distribution observed when astroglial (GFAP) or reactive microglial (CD68 + MHC II) markers were assessed in sagittal cerebella corresponding to AD, PD, HD, FTD, MND and CJD as well as control specimens are shown.

Concerning GFAP immunostaining, a radial (upper row) or horizontal (parallel to the pial surface; lower row) profiles were consistently observed in the molecular layer. Astrogliosis and Purkinje cell damage are shown in close association.

With regards to CD68 and MHC II studies, sparse immunostaining (mostly ramified or dystrophic morphology) was mainly located in white matter in samples from AD, PD, HD, FTD, MND and control. However, immunolabelling was highly extended, even in the granular layer, in the CJD specimen.

RESULTADOS

Although significant differences were found only for the HD group ($p < 0.05$; although $p = 0.07$ for CJD group), an increase in the intensity of GFAP immunostaining was observed in samples from all neurodegenerative diseases in comparison with controls. All pathological cerebella shared similar findings concerning GFAP detection, showing two alternative profiles in the molecular layer: an intense radial gliosis when GFAP intensity was higher (Figure 32) or matching varicose fibres parallel to the pial surface when GFAP intensity was lower (Figure 32). Astrogliosis seemed to be correlated with Purkinje cell loss on some occasions or at least with their damage.

Astrogliosis and microgliosis distribution are shown per layer in Figure 33. One of the most noteworthy findings consisted of null semi-quantitative scores for microglial, in contrast to the highest for astroglial cell counts in the Purkinje cell layer.

Reactive microglia immunostaining was observed only sparsely in cerebella from prion-like disease-affected patients. The intensity and pattern were similar to those of the control patients. These glial cells mainly presented a ramified or dystrophic morphology (Figures 32). Meanwhile, additional microglial shapes (rod-like and amoeboid, specifically) were found in the CJD cerebella. The extent of immunolabelling detecting reactive microglia was much higher in prion-affected cerebella than that detected in prion-like disease and control sections (Figure 32). *Post hoc* testing showed the existence of significant differences between them ($p < 0.05$). Microglial cells were extended to all layers in the former and were mostly located in white matter in the latter. Only in a few cases were they also present in the granular layer.

Astroglial and reactive microglial distribution patterns in the matched control group for comparison aims are illustrated in Figure 32.

RESULTADOS

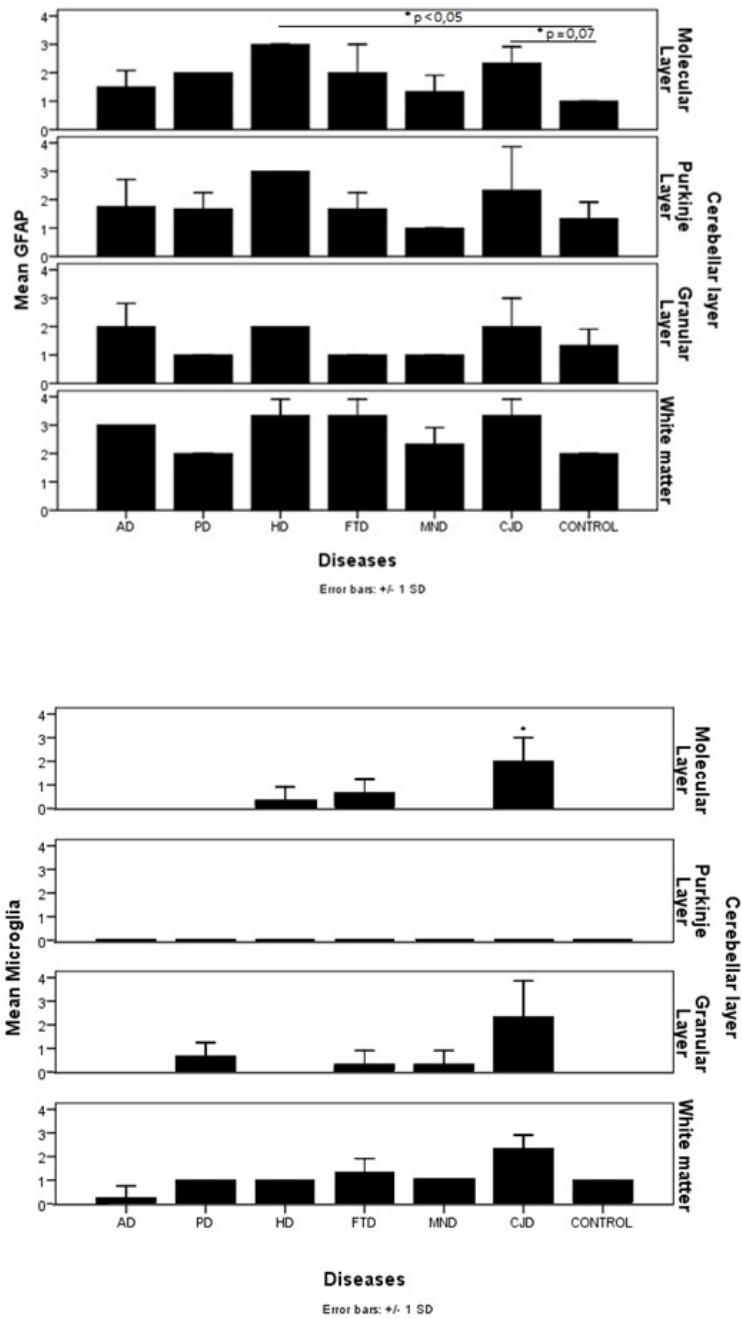


Figure 33. Astroglia and microglia scores between groups (AD, PD, HD, FTD, MND, CJD and control) in different layers are compared. Y axes represent semi-quantitative scale mean, and bars represent \pm SE; * $p < 0.05$, Kruskal-Wallis, Scheffe post hoc.

6.3.5 Discussion

To our knowledge, this is the first study to focus on the comparative assessment of glial profiles in human brains from affected prion and prion-like disorder patients. To suggest specific glial subpopulations in which prion diseases have an involvement similar to prion-like disorders was the final objective of the present study. A morphological approach using the cerebellum as an encephalic region prone to injuries and a reference area in neuroinflammation research has been performed to this end.

Prion-like disorder is a new medical term referring to neurological proteinopathies with a common denominator: disease-causing proteins spread in the brain in the same way as that first reported for prions (Prusiner, 2012; Fernandez-Borges et al., 2013; Prusiner, 2013). Despite the fact that, until recently, this common feature has been considered a leading factor in the neurodegenerative process that has been the main research focus, the pathogenic mechanisms are still unknown. Consequently, current therapeutic and palliative treatments are ineffective.

Historically, research regarding neurodegenerative disorders has focused on neurons as the main player in the neurodegenerative mechanism. However, more recent studies suggest glia as prominent contributors to this mechanism and even in some instances to disease initiation. The link between the neuroinflammation hypothesis and the main neurodegenerative disorder, such as Alzheimer's disease (Rogers et al., 1992; Guerriero et al., 2017), has also been extended to other neurodegenerative diseases (Hirsch et al., 2012; Crotti & Glass, 2015; Radford et al., 2015). Alteration of the BBB (Zhao et al., 2015) and release of cytokines are characteristics of this neuroinflammatory process (Estes & McAllister, 2014; DiSabato et al., 2016), and direct or indirectly, these features are related to glial cell population (Crotti & Glass, 2015).

In fact, microglial activation seems to be accepted as the main process leading to neuroinflammation (Derecki et al., 2014). Microglia constitute an immune network scanning any pathological changes in the microenvironment (Davalos et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2005). Because of their enormous plasticity, they can change their morphology and show a broad spectrum of phenotypic appearances corresponding to different disease states (Kreutzberg, 1996; Streit et al., 2014; Bachstetter et al., 2015). This particular feature is in accordance with results provided here, where differences among microglial shapes depending

RESULTADOS

on the pathology would suggest a higher involvement of this activated glial population in prion than in prion-like disorders. Ramified amoeboid morphologies of these glial cells extended throughout the prion-affected cerebella demonstrate their evident activation (v Eitzen et al., 1998; Brown, 2001). As the amoeboid phenotype corresponds to the most activated shape (Boche et al., 2013; Streit et al., 2014) and is associated with the phagocytic state, the presence of this phenotype in prion disease samples seems to be stimulated by the high accumulation of pathological prion protein (Muhleisen et al., 1995). This would also justify the absence of amoeboid microglia in prion-like disease-affected cerebella, as this brain area does not constitute the preferential site for the accumulation of the characteristic aberrant protein. Overall, the role of microglial activation in neurodegeneration may be related to their phagocytic properties for aberrant protein removal to a higher extent than with other functions attributed to this cellular type.

On the other hand, microglial cells showing dystrophic appearance may indicate neuropathological impairment. They are probably capable of releasing cytokines to stimulate the inflammatory brain response, presumably by astrocytes (Bianco et al., 2005; Saijo & Glass, 2011; Cekanaviciute & Buckwalter, 2016). In fact, it has been recently demonstrated that activated microglia can induce astrogliosis with neurotoxic functions (Liddel et al., 2017). The findings described in this study would be in accordance with this possible induction. Although the astroglial population remains only indirectly associated with neuroinflammation, our previous studies using natural Scrapie as a prion model demonstrated an indisputable relationship between this glial population and the propagation and evolution of the disease (Sarasa et al., 2012; Hernandez et al., 2014). The present study provided findings in the same line concerning not only prion but also other neurodegenerative disorders studied here. Astrocytic profiles similar to those found in the Scrapie model were shared by all of them. This confirms astrocyte activation as a common denominator for prion and prion-like disorders. The consistent presence of astroglial populations around protein deposits reinforces the involvement of these glial cells in neurodegenerative progress.

Those astroglial immunohistochemical patterns found in the cerebella from patients affected by all disorders included here were similar to those reported in the study dealing with natural Scrapie as a model of prion diseases. They matched up with Bergmann glia or varicose fibres parallel to the pial surface, suggesting that the glial stem cell response protects against or compensates for neuronal loss (Alvarez et al., 2015). To determine whether they represent different states as neural progenitors for neuroglial cells, further studies focused on their role as stem cells are currently being developed.

RESULTADOS

On the other hand, the highest affectation of the Purkinje cell layer observed in the cerebellum from all samples assessed here has also been previously reported in relation to other neurodegenerative disorders (Sarna & Hawkes, 2003). A close relationship between an increase in hypertrophic astrocytes and loss of Purkinje cells in this layer has also been postulated in familiar (Fukutani et al., 1996) and sporadic AD (Garcés et al., 2016). Similar observations were also provided by the Scrapie model used by our group in the previously cited study (Hernandez et al., 2014). When they were closely observed in ultrastructural studies, vacuolation preferentially occurring around Purkinje cells displayed a close relation with glial cells (Sarasa et al., 2015). This fact again points to astroglia as the main cellular type involved in neurodegenerative lesions.

Several hypotheses have been formed about the potential role of neuroglia in neuroinflammation, although they are still under discussion. These cells could exclusively have a neuroprotective role due to immune properties (Wyss-Coray et al., 2001; Liu et al., 2017). However, they could also imply a neurotoxic effect provoked by over-activation deriving from chronic inflammation (Streit et al., 2004; Heneka et al., 2015). They could also alter homeostasis, causing brain damage or functional loss.

In conclusion, the present study represents a novel advance regarding this subject because astroglial activation has been confirmed as a common cellular denominator for prion and prion-like disorders in the area assessed. The involvement of astrocytes as key elements in the pathogenesis and pathology of diseases and injuries of the central nervous system has been addressed in a very recently published study (Ferrer, 2017), suggesting that their knowledge will permit a better understanding of brain ageing and neurodegenerative diseases as complex disorders in which neurons are not the only players.

Moreover, similar immunohistochemical patterns for this astrocytic reaction found in the cerebella from patients affected by all neurodegenerative disorders suggest a glial stem cell response. Further studies are necessary to clarify their protective or neurotoxic role in neurodegenerative progression.

**6.4 MORPHOLOGICAL STUDIES FOR ASSESSMENT OF GLIAL
ALTERATIONS IN ORDER TO DETERMINE THEIR POTENTIAL
ASSOCIATION WITH DIFFERENT PRION TYPES**

6.4.1 Abstract

The aim of this study was to describe regional profiles of astroglial and microglial activation in Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) types in order to analyze the influence of prion strain. The intensity and distribution of astrogliosis, activated microglia, PrP^{Sc} accumulation and spongiform changes in cerebellum and frontal cortex were comparatively assessed with non-dementia patients in a total of 18 brains, representative of the entire spectrum of CJD types. Microglial activation correlated to astrogliosis. Spongiosis, but not PrP^{Sc} deposition, correlated to both astrogliosis and microgliosis. At ultrastructural level, astrocytic gliofilaments were consistently observed in relation with pathological changes associated with prion disease. Despite no differences in the extent and distribution of these both variables were seen among disease types, specific morphological glial changes are shared by all cases, regardless the causing prion type. This confirms that neuroglia play a leading role in the neurodegenerative process.

Keywords: astroglia, microglia, interlaminar astroglia, prion types, cortex, cerebellum.

6.4.2 Introduction

Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) is a progressive neurodegenerative syndrome characterized by long incubation periods and fatal outcome. The most accepted hypothesis to causative agent in this group of neurodegenerative diseases is the accumulation of misfolded prion protein (PrP^{Sc}; Prusiner 1982). In the neuropathological frame, PrP^{Sc} deposition is the most important feature that stands out among others as vacuolation, neuronal loss and gliosis. Although the lack of immune response was classically joined to prion disease pathogenesis, glial involvement has been consistently evidenced (Diedrich et al., 1991; Moser et al., 1995; Liberski et al., 1997; Giese et al., 1998; Kovacs et al., 2005; Carroll et al., 2016; Krejciova et al., 2017) pointing out this cellular population as a crucial player according with the current neuroinflammatory hypothesis (Estes & McAllister, 2014; DiSabato et al., 2016; Kempuraj et al., 2016; Ransohoff, 2016).

Several authors tend to hold microglia responsible for the neurodegenerative process characteristic of this group of diseases, as it is the main immune cell of the central nervous system (Brown et al., 1996; Peyrin et al., 1999; Gomez-Nicola et al., 2013). Studies about them and their morphological alterations seem to elucidate relevant information about the role of their activation in the neurodegenerative diseases (Boche et al., 2013; Streit et al., 2014). Evidence indicates that this activated cellular type, besides contributing to the clearance of damaged cellular material and protein aggregates, may induce a neuroinflammatory state which accelerates the development of neurodegeneration (Graeber et al., 1994).

In contrast, astroglia was initially considered as building a cellular network in order to support neurons (Sofroniew & Vinters, 2010). But some studies establishing close collaboration between these glial cells, microglia and brain blood barrier (BBB) have been reported (Abbott et al., 2006; Iadecola & Nedergaard, 2007). Furthermore, some others providing additional evidence that astrocytes might contribute to the pathogenesis of neurodegenerative diseases (Marella & Chabry, 2004; Yamanaka et al., 2008; Gu et al., 2010; Liddel et al., 2017) have been also published. Based on this lead role of gliosis as key regulator of neuroinflammation, some studies so far have addressed the issue of astrocytic and microglial activation in prion diseases, establishing at the same time a potential neurotoxic (Brown, 1999; Peyrin et al., 1999; Marella & Chabry, 2004; Crespo et al., 2012; Gomez-Nicola et al., 2013) or neuroprotective role (Zhu et al., 2016; Aguzzi & Liu, 2017; Carroll et al., 2018) for both cellular types.

RESULTADOS

On the other hand, the widely known phenotypic heterogeneity of prion diseases establishes the existence of several CJD types depending on its origin (genetic, acquired or sporadic; Ironside et al., 2017). This variability depends on prion strains, defined by natural infectious isolates characterized by distinctive clinical and neuropathological features which are faithfully recapitulated in animal models by transmission studies (Bruce et al., 1993).

A recent study proposes microgliosis profiles as valid support to molecular and histopathological typing as they contribute to prion strain characterization (Franceschini et al., 2018b). However, our recent study focused on the analysis of histopathological lesions, PrP^{Sc} deposition, astroglial and microglial activation did not show prion strain influence when sCJD and fCJD were preliminary compared (Monzón et al., 2018). To our knowledge, an exhaustive study about the possible relationship among all these findings which constitute neuropathological hallmarks of prion diseases encompassing cases of different CJD types have been not developed to date. Despite morphological studies are considered to exclusively provide descriptive results by some authors, to link neuroinflammation and glial phenotypic changes in neurological diseases constitutes a current research topic in several World's top journals.

Thus, in order to contribute to the determination of the actual role of host immune response in prion diseases, to characterize the morphological, distribution and intensity profiles of astroglial and reactive microglial populations as pivotal leaders in the neuroinflammatory process in the different human prion diseases (genetic, gCJD; iatrogenic, iCJD; variant, vCJD; sporadic, sCJD; and variably protease-sensitive prionopathy, VPSP) is intended here. Each profile will be correlated with histopathological findings and PrP^{Sc} accumulation in cerebellum and frontal lobe samples as one of the most and the least affected encephalic areas, respectively. In contrast to previous studies, the final aim consisted of paying special attention about common observations to all CJD types regarding morphological changes instead of diversity among them.

RESULTADOS

6.4.3 Material and methods

Samples

All samples were kindly provided by the UK brain tissue Network following the guidelines on this matter of National legislation. They came from Centre for Clinical Brain Sciences of University of Edinburgh and consisted of a total of 21 affected cases by different subtypes of CJD (sCJD, vCJD, gCJD, iCJD and VPSP_r) and 3 additional non-dementia controls (Table 5).

Table 5.-Clinical data of CJD patients affected

<i>Patient</i>	<i>Aetiology</i>	<i>Gender</i>	<i>Age</i>	<i>Genetic data</i>	<i>PrPisotype</i>
1	Sporadic	M	70	MM nil	2
2	Sporadic	M	70	MM nil	2
3	Sporadic	F	78	MM nil	1
4	Sporadic	M	71	MV nil	2
5	Sporadic	F	63	MV nil	2
6	Sporadic	F	71	MV nil	2
7	Sporadic	M	74	VV nil	2
8	Sporadic	F	73	VV nil	2
9	Sporadic	F	77	VV nil	2
10	Familial	F	56	MM E200K	na
11	Familial	M	78	MV E200K	na
12	Familial	F	53	MM E200K	na
13	Iatrogenic (GHT)	M	42	MM nil	1
14	Iatrogenic (GHT)	F	34	MV nil	1+2
15	Iatrogenic (DURA)	F	27	MM nil	1
16	Variant	M	59	MM nil	2B
17	Variant	M	62	MM nil	2B

RESULTADOS

18	Variant	F	32	MM nil	2B
19	VPSPr	M	66	VV	
20	VPSPr	F	76	VV IMWt	
21	VPSPR	M	66	MV	
22	Control	F	69		
23	Control	M	63		
24	Control	M	74		

Formalin-fixed sections of 3 - 5 mm corresponding to sagittal cerebellar (including granular, Purkinje cell, molecular layers and white matter) and frontal cortex (including I to VI layers and white matter) samples were included in the study. Tissue slices were treated by immersion in formic acid for 1 h for prion inactivation.

Five μm sections from all samples were sectioned and histologically (haematoxylin - eosin staining, H/E) or immunostaining processed for several antibodies following previously described protocols (Monzón et al., 2018).

Research protocols applied on these samples were approved by the Ethical Committee for Clinical Research from Government of Aragón (CEICA; REFERENCE NUMBER: PI 15/0036, Acta Nº 05/2015).

GFAP immunolabelling

After endogenous peroxidase inactivation by incubation of all sections with peroxidase blocking reagent (5 min; DAKO, Germany), they were incubated with a primary antibody against glial fibrillary acidic protein (GFAP, 1/500 for 30 min RT; DAKO), followed by an incubation with enzyme-conjugated polymer Envision™ (30 min, RT; DAKO). Then, DAB PLUS (10 min) was used as chromogen. Sections were counter-stained with haematoxylin.

Reactive microglia detection

The protocol used for reactive microglia labelling was the same as that applied for GFAP, with the exception of primary antibody. In this case, CD68 (1/500, 30 min RT; DAKO) and MHCII (1/200, 30 min RT; DAKO) were used.

RESULTADOS

PrP^{Sc} detection

Briefly, it was necessary to include an epitope unmasking protocol consisting of 96% formic acid immersion (5 min), digestion with proteinase K (5 min, RT; Life Technologies, USA) and autoclaving in distilled water (10 min). After incubation with a specific prion protein antibody (12F10 at 1/1700 dilution; SPI Bio, Darmstadt, Germany) for 1 h RT, EnVision™ mouse polymer (DAKO, Glostrup, Denmark) for 30 min RT as visualization system was used. Following the previously described scoring system (Monzón et al. 2018), allimmunolabelled sections were thoroughly assessed in each layer regarding morphology, intensity and distribution variations.

In accordance with it, scores were from negative (-) to maximum (++++), according with the density and the extension of the labeling deposits. Spongiosis was also subjectively scored according to the number of vacuoles, from absence (-) to very high number (++++). Furthermore, immunostaining morphology for each marker was classified according with prior described patterns: linear, granular, spot, coalescent or plaques, pericellular, patchy, perivacuolar, perivascular, plaque-like, plaque (kuru, unicentric, multicentric, florid plaque, miniplaques), coarse or synaptic, for PrP^{Sc}, severe diffuse, moderate, perineuronal or radial, for GFAP (Sofroniew 2009); ramified, amoeboid, dystrophic or rod-like for reactive microglia.

Statistical analysis

Rating data were entered into an Excel spreadsheet and analysed by the Methodological and Statistical Support Service of Research Support General Service - SAI, University of Zaragoza.

With the aim of testing for normality of the distribution, Kolmogorov Smirnov test was conducted. Kruskal-Wallis test was performed for analysis. As significant differences between the groups were detected, Mann Whitney U test *post hoc* testing (Bonferroni correction) was performed to identify the groups which significant differences existed.

Correlation between all variables analysed was measured by Pearson's correlation.

P values < 0.05 were considered statistically significant.

Electron microscopy studies

With the aim of visualizing potential morphological alterations in the different CJD types an ultrastructural study was performed. Post-fixation with glutaraldehyde 2.5% and 2% osmium

RESULTADOS

before embedding in araldite (Durcupan, Fluka AG, Buchs SG, Switzerland) was followed in all cases. Ultrathin (0.08 μm) sections were cut from 1% toluidine blue stained semi-thin sections (1.5 μm), collected on Formvar coated single-slot grids and counterstained with 1% uranyl acetate and Reynold's lead citrate for 10 min. Samples were examined under FEI Tecnai G2 Spirit (60,000 KV).

6.4.4 Results

Evaluation of glial profiles in different CJD types.-Overall, the degrees of GFAP and activated microglia immunoreactivity were significantly related to CJD types in both regions of the brain ($P < 0.001$ in all cases except for microglia in cerebellum where $P = 0.007$; Table 6). The highest GFAP immunostaining was achieved by iCJD (3.25 ± 0.87) and sCJD (2.29 ± 1.02) cerebellar and cortical samples, respectively. Microglial immunoreactivity showed low intensity in all samples but especially in iCJD, vCJD and VPSPr where they ranged between 0.50 - 0.83 in cerebellum and 0.29 - 0.76 in frontal cortex. The highest values were found in cerebellum from sCJD (1.47 ± 1.21) and frontal cortex from fCJD (1.95 ± 0.80).

Table 6.- Correlation among spongiosis, PrP^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis in all CJD types analysed in the study (Pearson's correlation).

		PrP ^{Sc}	GFAP	Microglia
Spongiosis	Pearson's correlation	,301**	,164**	,205**
	p-value	0,000	0,008	0,001
PrP	Pearson's correlation	1,00	-0,06	0,09
	p-value		0,313	0,127
GFAP	Pearson's correlation		1,00	,219**
	p-value			0,000

Correlative analysis among microgliosis, astrogliosis, spongiosis and PrP^{Sc} accumulation.- Interestingly, PrP^{Sc} deposition was not related to any glial profiles (Table 6). However, spongiosis correlated to activation of both, astroglial ($R=0.164$; $P=0.008$) and also microglial ($R=0.205$; $P=0.001$) populations. Moreover, activation of these both glial cells highly correlated each other ($R= 0.219$; $P= 0.000$).

RESULTADOS

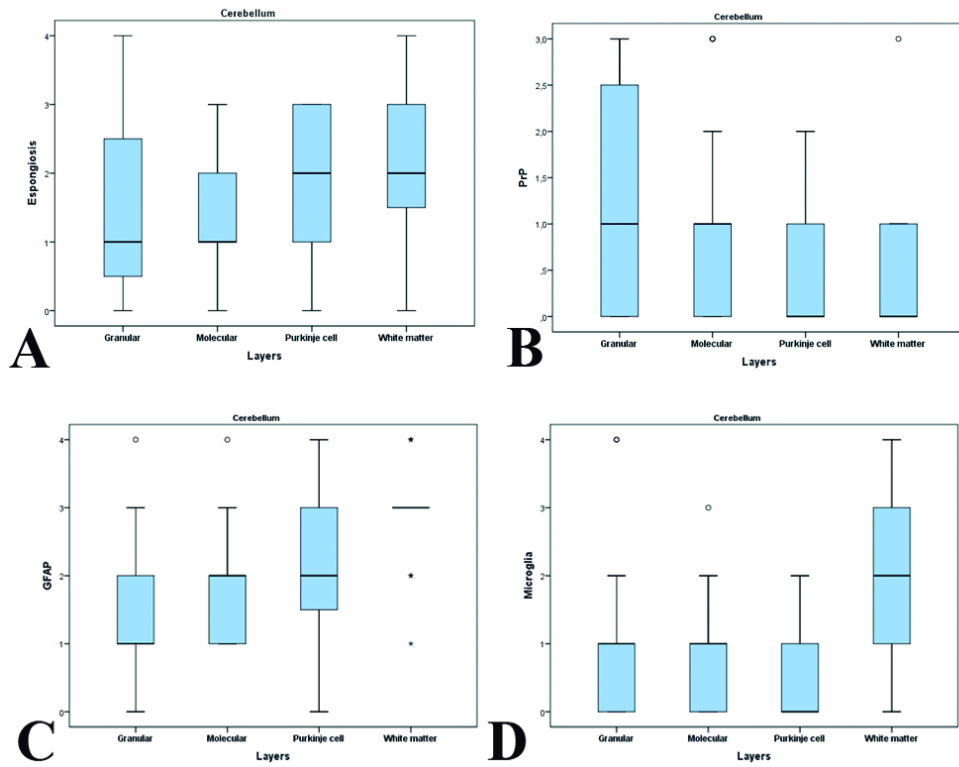


Figure 34.-Spongiosis, PrP^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in different layers from cerebellum are compared and drawn in box plots.

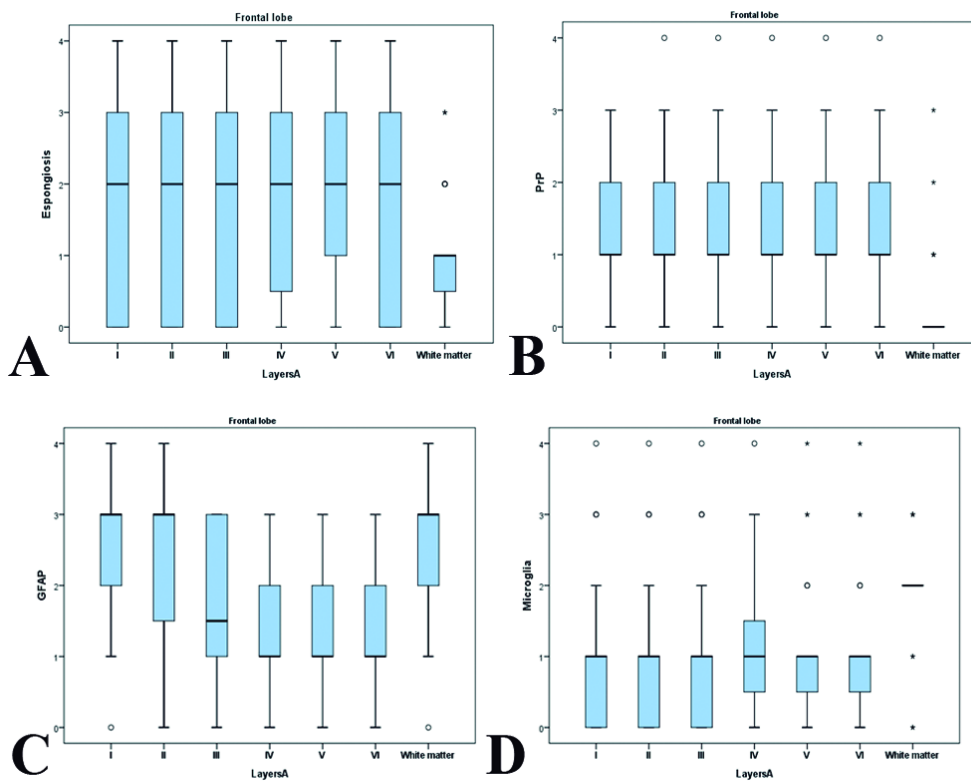


Figure 35.-Spongiosis, PrP^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in different layers from frontal cortex are compared and drawn in box plots.

RESULTADOS

RESULTADOS

Atypical unicentric plaques were seen in vCJD and also multicentric ones in some sCJD cases. Miniplaques in molecular layer of cerebellum was detected in one sample of VPSPr (Figure 37). As expected, white matter showed the lowest PrP^{Sc} accumulation in relation to grey matter from both brain regions (0.46 ± 0.72 in cerebellum and 0.33 ± 0.76 in frontal cortex).

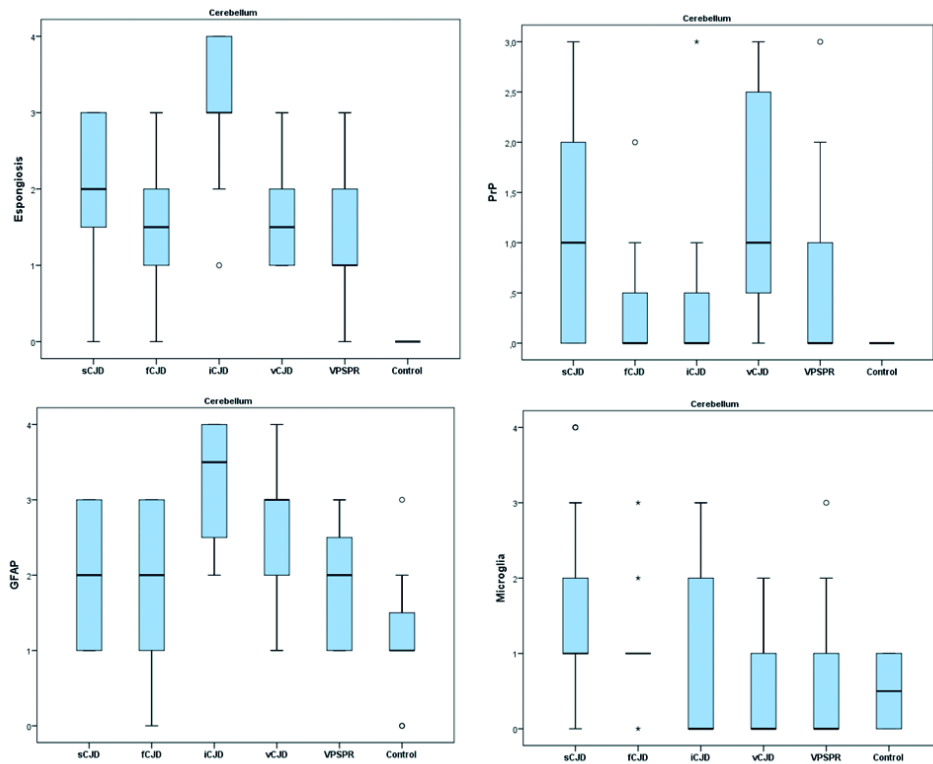


Figure 38.- Spongiosis, PrP^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in cerebellum from different prion types are compared and drawn in box plots.

RESULTADOS

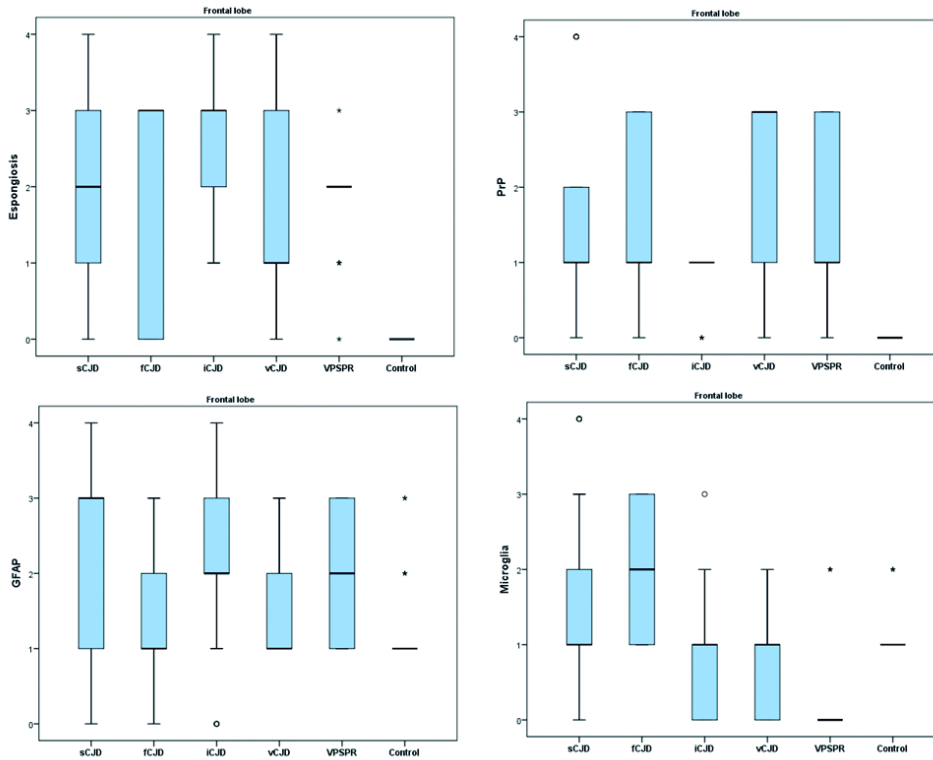


Figure 39.-Spongiosis, PrP^{Sc} accumulation, astrogliosis and microgliosis scores in frontal cortex from different prion types are compared and drawn in box plots.

In contrast, glial activation significantly increased reaching the highest values in this matter of astrogliosis (2.96 ± 0.69 and 2.54 ± 0.93) as well as microgliosis (1.92 ± 1.02 and 1.92 ± 0.78) in cerebellum and frontal cortex (Figures 34 and 35, respectively).

RESULTADOS

Surprisingly, when variables regarding glial activation were assessed to depend on individual patient genotypes, no statistical differences were found when microgliosis was assessed, but they were when astrogliosis was ($P<0.001$). The MM1 subjects showed the highest astroglial (2.91 ± 0.70) as well as microglial (2.91 ± 1.45) activation (Figures 38 and 39).

Glial morphological changes.- As found in our previous studies (Garcés et al., 2016; Monzón et al., 2018), all pathological cerebella shared two alternative GFAP immunostaining profiles in molecular layer. It consisted of a mainly radial pattern when astroglial intensity was higher or matching varicose fibres parallel to pial surface when it was lower (Figure 40).

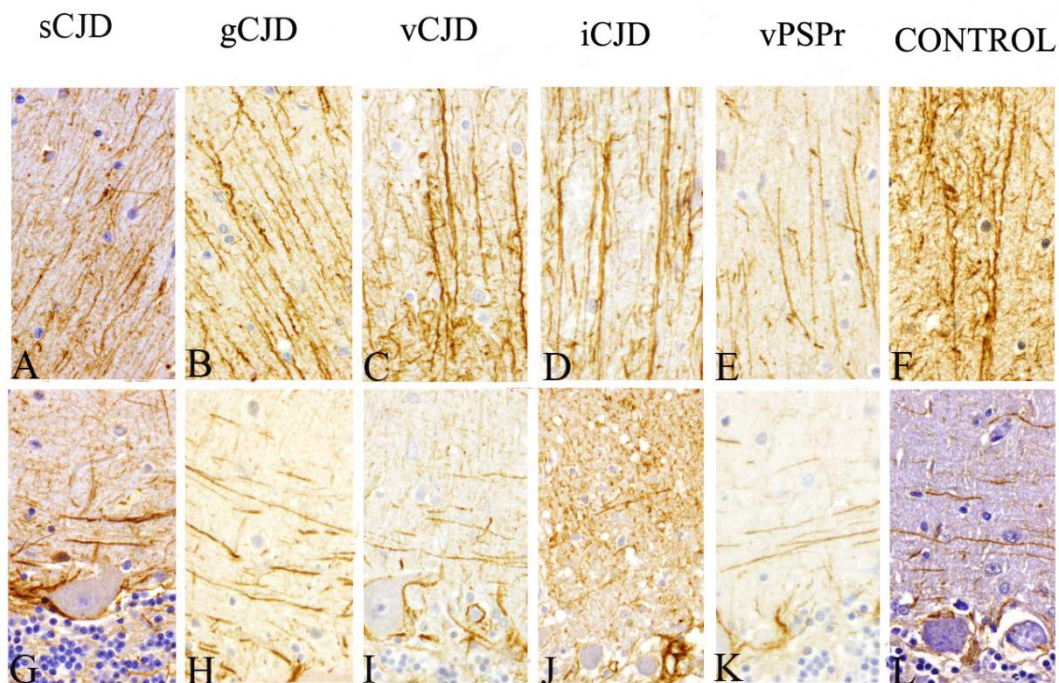


Figure 40.-Immunohistochemical patterns observed when astroglial marker (GFAP) was assessed in sagittal cerebella corresponding to each CJD subtypes as well as control specimens. Alternative (A-F) radial and (G-L) horizontal (parallel to the pial surface) profiles were consistently observed in the molecular layer.

RESULTADOS

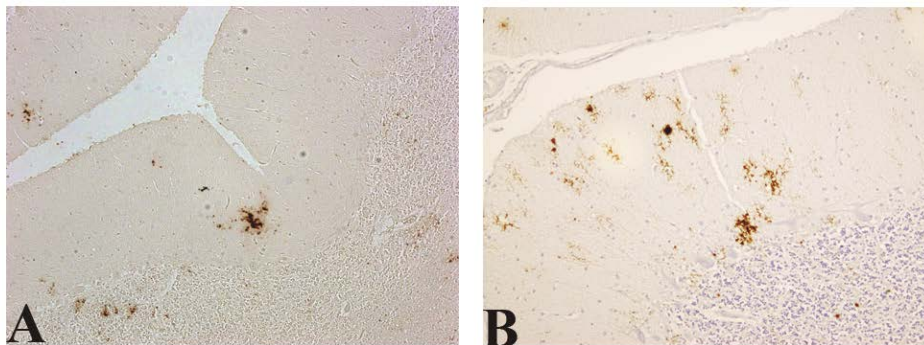


Figure 41.- A) NG2 and B) PrP^{Sc} immunostaining in molecular layer from a vCJD cerebellum.

In an attempt to approach to identify this last pattern as specific progenitor cells, immunohistochemistry for NG2 detection (**METER cita Julio**) was carried out on some of these samples this identity. Some NG2 positive cells matched with pericellular PrP^{Sc} deposits (Figure 41).

Concerning the cortical brain region analyzed, mild GFAP staining in meninge of control samples which evidently raised its intensity in I, II and III layers coinciding with typical astrocyte morphology of supragranular layers called interlaminar glia were detected. This morphology showed in all samples that defined as “cable-like” fibers with radial morphology (Figure 42).

On the other hand, in CJD samples an increase of meninge GFAP staining and the rise of number of typical GFAP cells + with spheric morphology in external layer were found. The interlaminar glia showed several morphological changes that varied from disorganization, disappearing and/or replacement by typical stellate astroglial cells, increase of number of terminal masses and disruption of interlaminar glial cells (Figure 42). An increase of astrocytes surrounding blood vessels were found in internal layers.

In panencephalopathic case, the highest reactive morphology with spherical pale nucleus and few cellular extensions were showed. Spherical astroglia was observed in WM. The interlaminar astroglia showed the thickest fibers in spite of the destruction of typical cytoarchitectonic of the frontal cortex.

RESULTADOS

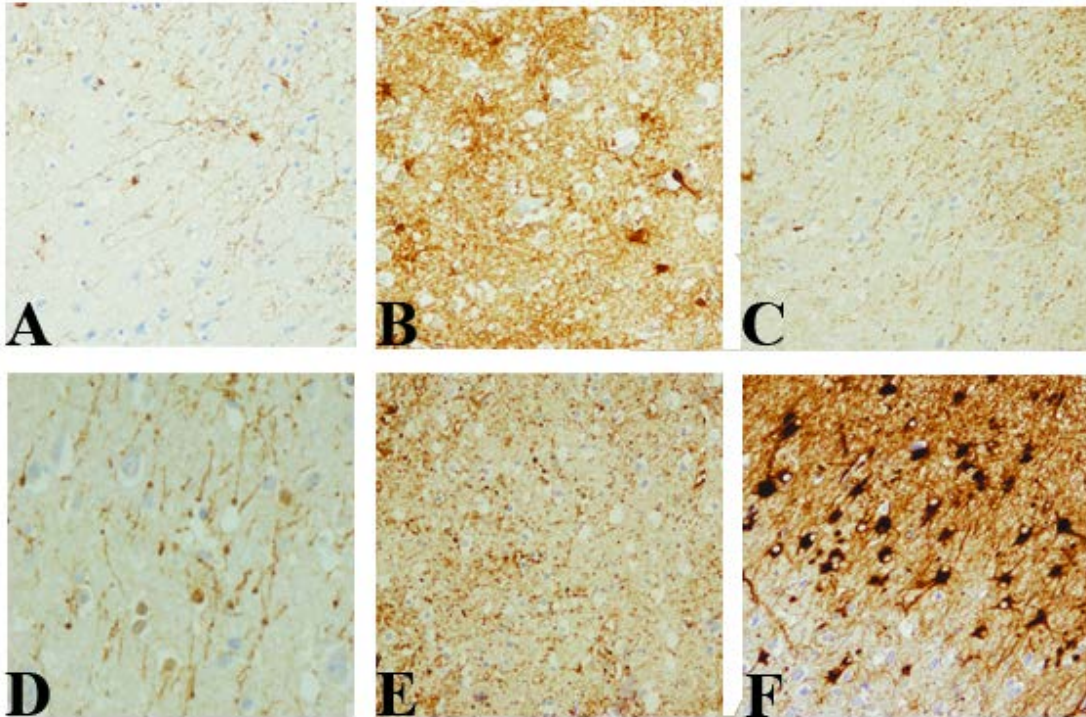


Figure 42.- Different morphological changes of interlaminar astroglia in CJD cases A) Interlaminar astroglia in healthy control B) Replacement of interlaminar astroglia by typical stellate astroglial cells matching with increase of astrogliosis. C) Increase of number of terminal masses of interlaminar astroglia D) Increase of diameter of terminal masses. E) Disruption of interlaminar glia in I – III frontal cortex CJD F) Atypical case of increased thickening of interlaminar astroglia in panencephalopathic CJD (Magnification: 200x, except for D) 400 x).

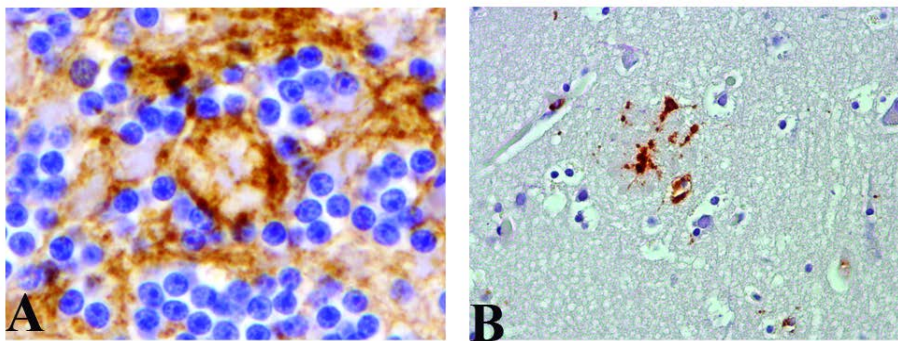


Figure 43.- Glial cells associated to protein deposits. A) Astrocytic process associated to Kuru plaque in granular layer of cerebellum. B) Microglial process associated to protein aggregation or clustered morphology associated to protein deposit. Magnification: ???

RESULTADOS

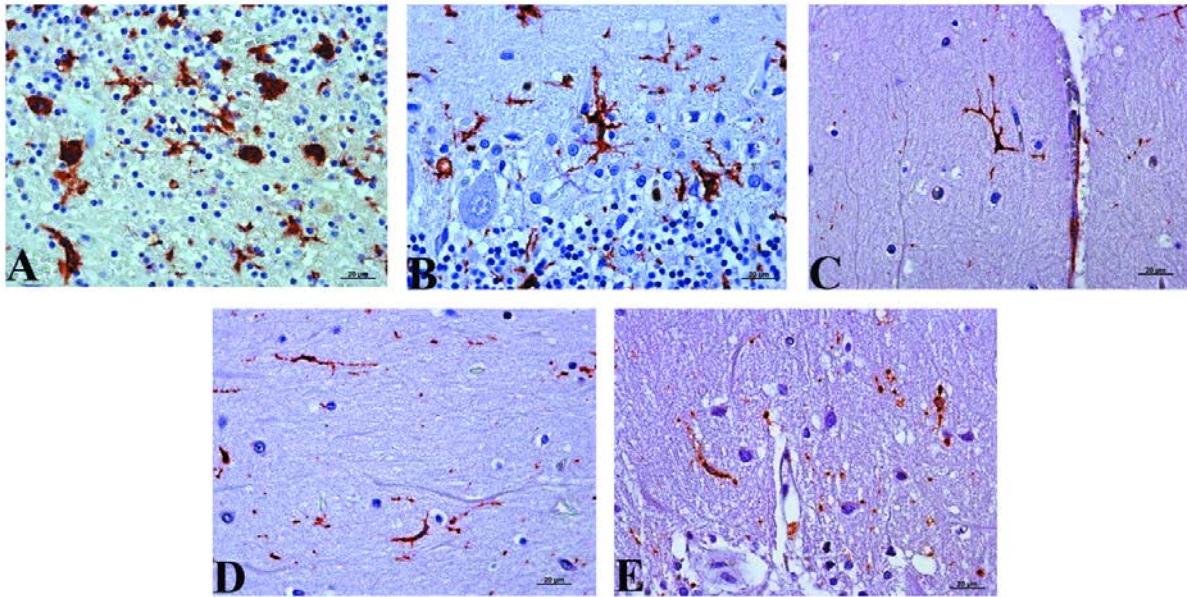


Figure 43.- Microglial morphology found in CB cerebellum. A) amoeboid B) activated ramified C) ramified D) Rod-like E) Dystrophic.

Specific astroglial immunostaining always appeared associated with several protein aggregates, not exclusively kuru plaques. Concerning microglial labeling, it was found to be associated with protein aggregation or clustered morphology associated to protein deposit, but in scarce occasions(Figure 43).

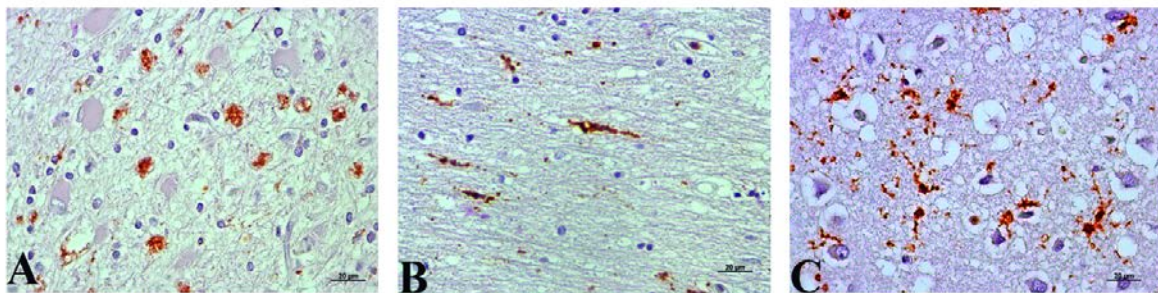


Figure 44.- Microglial morphology found in CID frontal cortex. A) Amoeboid B) Rod-like C) Dystrophic.

RESULTADOS

Ramified reactive microglia scattered over all the examined areas from control cerebella was found. Except for those cerebella which had presented granular layer degenerated where amoeboid appearance was evidenced. In CJD cases different morphological patterns were also associated with intensity degree in this brain region: amoeboid, activated ramified, rod-like and dystrophic (Figure 44). Microglia in Purkinje cell layer remained ramified pattern unlike those in white matter frequently showing amoeboid shapes. On the contrary, in all CJD frontal cortex dystrophic pattern was constant despite amoeboid, rod-like and clustered (in association with protein deposits; Figure 45) were also found in some occasions. Control cortex showed a scattered sparsely microglial immunostaining. All healthy control cortex samples showed a reduced quantity of microglial cells in comparison with CJD samples and sometimes with dystrophic morphology.

Ultrastructural findings.- Because they came from tissue banks, despite samples showed well-preserved membranes, mitochondria crests and homogeneous content in the matrix, they showed a much poorer preservation of their ultrastructure in comparison with themselves in case they had been fixed with aldehydes to acquire higher quality images. Moreover, it is well known the spongiotic changes associated with CJD neurodegenerative process cause the huge tislular damage visualized in all following micrographs. This makes harder to distinguish pathologic lesions from artifacts due to fixation at this sub-cellular level.

However, all CJD samples allowed observing distinctive ultrastructural pathological changes of prion disease in relation with intermediate gliofilaments. This organelle, as the most characteristic component in astrocytes, was located in close association with characteristic lesions as vacuolation or alteration of myelin (Figure 46).

Figure 45.-An evident increase of astroglial filaments were found to be associated with (a)alteration of myelin and b) vacuolation (membrane disruption and curled fragments inside).

6.4.5 DISCUSSION

The hallmark neuropathological features of prion diseases are spongiosis, misfolding prion protein deposits and gliosis. Traditionally, pathological prion protein accumulation and their relation to neuronal death have monopolized prion research, despite gliosis has been always found in prion-affected brains. Immunological function of glial cells had classically remained on the sidelines in this group of diseases.

Nevertheless, in recent years the neuroinflammatory hypothesis has suggested that host immune system is deeply involved in neurodegeneration, playing an accelerating or even causing role in this process (Estes & McAllister, 2014; Pasqualetti et al., 2015; Ransohoff, 2016). Inflammation implicates variations in levels of immunological molecules (cytokines and interleukins), blood brain barrier (BBB) breakdown and leukocyte infiltration. This last characteristic is found neither prion diseases nor other neurodegenerative diseases, but it makes the difference with classic inflammation showed in other brain pathologies caused by infectious pathogens.

The present study has been focused on reactive astroglia and microglia as major glial cells involved in the immune response and consequently, in the process of neuroinflammation. Cerebellum, as one of the most affected encephalic areas and frontal cortex, as a brain region wherein prion propagation is more retarded in CJD types have been included. Furthermore, it results relevant to point out the fact that biopsies from these both brain regions have been used for diagnosis of clinical CJD cases. Some previous studies have been developed in order to establish different glial profiles in order to support molecular and histopathological typing for

RESULTADOS

prion strain characterization (Franceschini et al. 2018; Kim et al. 2018). On the contrary, the study presented here represents an attempt to establish for first time specific variations of neuroglia activation as a common denominator for all prion types.

This and other published quantitative studies have demonstrated a high heterogeneity of glial distribution and intensity among different CJD types, probably in accordance with individual host immune system role. Perhaps it is also because, as known, neuroinflammation is not homogeneous, affecting cerebral areas not equally and that is why glial cells, although being defined as a fundamental part of the process, do not behave equally in all cases. Probably, different phases of a lineal process which is occurring are showed in each sample. Several actors would take part in this event of neuroinflammation. The close correlation between astrogliosis and microgliosis demonstrated in this study would support this hypothesis proposing that a combination of both glial type effects could explain the neuroinflammation by mediating or exacerbating the toxic effects of protein accumulation in the brain. But apart from this, the fact of describing glial hyperplasia / hypertrophy closely related to spongiosis as pathological change associated with prion disease, confirmed by ultrastructural examination in this and our previous studies on animal (Sarasa et al., 2012 and 2015) as well as human prion (Monzón et al. 2018) affected brains, indisputably support the essential role of neuroglia in neurodegenerative process. All together, it would support a potential cooperative action between astrocytes and microglia for neuronal damage as previously suggested by some other authors.

Spite of microgliosis has been strongly associated to PrP^{Sc} deposits in the frame of sCJD suggesting the existence of diverse microglial patterns associated to different subtypes of sCJD some exceptions have been detected. For instance, the MMT2 subtype is an exception (Franceschini et al., 2018a). Some factors as the disease progress, besides the microglial pleomorphism which is highly related to different functions or microglial states could explain this.

By the other hand, the lack of correlation between PrP^{Sc} deposits and glial profiles would confirm the idea that not only misfolded protein deposit would cause neurodegeneration. It would discard the hypothesis about the neurotoxic effect of PrP^{Sc} with no requirement of these historically supporting cells. It might be a much more complex process, being the consequence of the neuroinflammatory process (Gomez-Nicola et al., 2013; Obst et al., 2017).

According to our results in all types of CJD, other authors found no association between spongiosis and PrP^{Sc} deposition in sCJD and vCJD tissue (MacDonald et al., 1996; Armstrong et

RESULTADOS

al., 2001, 2003). This fact confirms that other pathological events could occur in prion disease, maybe, compatible to neuroinflammatory process, the glial cells are main character.

However, this and our previous qualitative studies about morphological astroglial changes (Garcés et al., 2016; Monzón et al., 2018) constitute a useful tool for approach to prion pathogenesis by evidence of common profiles shared by all CJD cases, even regardless prion types. Several studies had been focused on the involvement of this glial cell in prion diseases by using cell cultures or experimental animals, but just few of them make a comparative study of their morphology among the different types of CJD. And those developed, as mentioned above, constituted an attempt to establish differential glial profiles in order to help to identify each CJD type (Franceschini et al. 2018). Just the opposite of our objective pretended here which consists of determining neuroglia as a common turning point for prion disease.

Our results show a morphological and intensity shift in glial cells in the two brain areas studied, frontal lobe and cerebellum. In cerebellum, the morphological change between radial and varicose glia in molecular layer of cerebellum, had been reported in our previous studies in prion disease, in natural Scrapie model (Hernandez et al., 2014), gCJD and sCJD (Monzón et al., 2018) and Alzheimer's disease (Garcés et al., 2016). For the first time, these results have been observed in all CJD subtypes including VPSPr, a sporadic prionopathy.

Finally, an outstanding finding indispensable to be highlighted is following described. In the frontal lobe of all CJD types morphological changes in interlaminar astroglia have been detected for the first time. It had been previously described only in Alzheimer's disease (Colombo et al., 2002) and bipolar disorder (Webster et al., 2001). This cellular type is an astroglial population exclusively located in the frontal cortex of primates (Colombo & Reisin, 2004) and humans (Colombo et al., 1997) whose role is actually unknown. The results provided here about the morphological changes concerning this specific astroglia in prion diseases are in agreement with those described for Alzheimer's disease (Colombo et al., 2002). The variations evidenced in bipolar disorder are less pronounced and only mess or shortening of this cellular type was shown (Webster et al., 2001).

Thus, this morphological alteration has been associated with neurological signs. Maybe the prodromal phase of prion diseases including neurological symptoms (Zerr & Parchi, 2018) could be reflecting these astroglial changes, as pointed out by other authors (Kim et al. 2018).

In healthy state, it forms palisade or cable-like structures which cover the one to four layers of cerebral cortex. In neurological diseases such as Alzheimer's disease (Colombo et al., 2002), Down syndrome (Colombo et al., 2005) and psychological disorders (Webster et al., 2001) have

RESULTADOS

been reported alterations in this peculiar glia. For the first time, similar results are shown in prion diseases. These pathological changes have been mainly characterized as palisade disorganization, even breakdown, and massive presence of thicker terminal masses.

The presence of thicker terminal masses observed in some CJD cases here, had been detected in aged or adult (Colombo et al., 1997) as well as in Alzheimer's disease affected cases (Colombo et al., 2002). Its explanation seems to be to constitute a structure where a re-emplacment of intermediate filaments is happening. Nevertheless, the physiological changes occurring in these cells still remain unknown.

In those cases where the breakdown of the characteristic palisade of this astroglial type is evidenced, this neuropathological change might be triggered by alteration of the homeostasis associated with prion protein presence. Disruption, or even absence, described in this peculiar astroglial type, might also concur with subsequent images of a continuous process. Similarly, different astroglial shapes had been associated to different disease stages in natural Scrapie cerebellum model, varying between protoplasmatic or typical "star-like" astrocyte form to adult radial astroglia or varicose form (Hernández et al. 2014). These cells probably alter their morphology as consequence of central nervous system damage as strategy to repair it. Perhaps, they are disrupted or replaced by another astroglial type with this aim. Their immunoreactivity against NG2 as oligodendroglial progenitor marker, even considered as fourth glial type with astroglia, microglia and oligodroglia (Nishiyama et al., 2009; Dimou & Gallo, 2015; Kuspert et al., 2016), supports that glial stem cell response could confer an attempt to protect against or compensate for neuronal loss.

7 CONCLUSIONES

1. Mediante una revisión bibliográfica exhaustiva sobre las principales enfermedades neurodegenerativas que afectan a la especie humana, se llega a la conclusión de que todas ellas no sólo comparten la acumulación de proteínas incorrectamente plegadas, sino también muchas características neuropatológicas y moleculares. De hecho, la clasificación de algunas patologías, se solapa con las de otras. E incluso su diagnóstico resulta complicado al presentar características neuropatológicas asociadas a más de una de estas patologías.

2. Los trabajos realizados en esta tesis demuestran cambios morfológicos específicos en relación con la activación de la astrogliá como denominador común en las enfermedades priónicas y en las *prion-like*. Estos hallazgos representan un avance en el conocimiento de estas patologías al evidenciar que no sólo las neuronas sino también esta población neuroglial están implicadas en el proceso de neurodegeneración. Pero también constatan el valor de las enfermedades priónicas como modelo válido para el estudio de las patologías neurodegenerativas en el marco de la hipótesis neuroinflamatoria.

3. Los resultados obtenidos a partir del conjunto de los estudios incluidos en esta tesis, que evidencian de manera constante alteraciones en la astrogliá y en menor medida en la microgliá, en todas las enfermedades neurodegenerativas estudiadas, sugieren un papel relevante en el proceso neurodegenerativo de ambas poblaciones gliales.

4. Según los estudios comparativos llevados a cabo en los diferentes tipos de enfermedades priónicas (eECJ, gECJ, iECJ, vECJ y PVSP_r) se demuestra la alternancia de dos patrones astrogliales en la capa molecular del cerebelo en todas ellas. Por su morfología, podría sugerir una potencial actividad neurogénica, aunque se necesitan estudios adicionales para confirmarlo. Esta misma observación se repite en las muestras de las enfermedades *prion-like*.

CONCLUSIONES

5. Los cambios morfológicos relacionados con la astrogliáinterlaminar que solo habían sido observados en la enfermedad de Alzheimer, se describen también por vez primera en las enfermedades priónicas.

6. En el estudio llevado a cabo, además de evidenciar la activación microglial frente al proceso neurodegenerativo, se observa por primera vez la microglíadistrófica en las enfermedades priónicas.

7. De acuerdo a los hallazgos descritos en los estudios neuropatológicos incluidos en esta tesis, se ha descartado la correlación estadística entre la activación glial y la acumulación de PrP^{Sc}. Sin embargo, se demuestra dicha correlación entre las células gliales en relación con las principales características histopatológicas de la neurodegeneración, lo que confirman los estudios ultraestructurales llevados a cabo.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, N. J., Ronnback, L., & Hansson, E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci*, 7(1), 41-53.
- Aguzzi, A., & Liu, Y. (2017). A role for astroglia in prion diseases. *J Exp Med*, 214(12), 3477-3479.
- Ajroud-Driss, S., & Siddique, T. (2015). Sporadic and hereditary amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Biochim Biophys Acta*, 1852(4), 679-684.
- Al-Chalabi, A., Jones, A., Troakes, C., King, A., Al-Sarraj, S., & van den Berg, L. H. (2012). The genetics and neuropathology of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 124(3), 339-352.
- Alafuzoff, I., & Hartikainen, P. (2017). Alpha-synucleinopathies. *Handb Clin Neurol*, 145, 339-353.
- Aldous, P. (1990). BSE: spongiform encephalopathy found in cat. *Nature*, 345 (6272), 194.
- Alvarez, M. I., Rivas, L., Lacruz, C., & Toledano, A. (2015). Astroglial cell subtypes in the cerebella of normal adults, elderly adults, and patients with Alzheimer's disease: a histological and immunohistochemical comparison. *Glia*, 63(2), 287-312.
- Alzheimer, A., Stelzmann, R. A., Schnitzlein, H. N., & Murtagh, F. R. (1995). An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde". *Clin Anat*, 8(6), 429-431.
- Andrew, S. E., Goldberg, Y. P., Kremer, B., Telenius, H., Theilmann, J., Adam, S., Starr, E., Squitieri, F., Lin, B., Kalchman, M. A., & et al. (1993). The relationship between trinucleotide (CAG) repeat length and clinical features of Huntington's disease. *Nat Genet*, 4(4), 398-403.
- Apfel, M. I., Esberard, C. A., Rodrigues, F. K., Bahamad Junior, F. M., & Sillero, R. O. (2002). Stereologic study of the cerebellar Purkinje cells submitted to alcoholic intoxication in Wistar rats]. *Arq Neuropsiquiatr*, 60(2-A), 258-263.
- Armstrong, R. A., Cairns, N. J., Lantos, P.L. (2001) Quantification of the vacuolation (spongiform change) and prion protein deposition in 11 patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol*. 102(6):591-6.

BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong, R.A., Lantos P. L., Ironside J. W., Cairns N. J. (2003) Spatial correlation between the vacuolation, prion protein, deposition and surviving neurons in patients with Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). *J Neural Transm (Vienna)*. 110(11):1303-11.
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A. L., Welch, J., Hill, A. F., Lloyd, S. E., Wadsworth, J. D., & Collinge, J. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J*, 21(23), 6358-6366.
- Ayers, J. I., Fromholt, S., Koch, M., DeBosier, A., McMahon, B., Xu, G., & Borchelt, D. R. (2014). Experimental transmissibility of mutant SOD1 motor neuron disease. *Acta Neuropathol*, 128(6), 791-803.
- Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., & Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*, 24(6).
- Bachstetter, A. D., Van Eldik, L. J., Schmitt, F. A., Neltner, J. H., Ighodaro, E. T., Webster, S. J., Patel, E., Abner, E. L., Kryscio, R. J., & Nelson, P. T. (2015). Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol Commun*, 3, 32.
- Baiardi, S., Magherini, A., Capellari, S., Redaelli, V., Ladogana, A., Rossi, M., Tagliavini, F., Pocchiari, M., Giaccone, G., & Parchi, P. (2017). Towards an early clinical diagnosis of sporadic CJD VV2 (ataxic type). *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 88(9), 764-772.
- Baker, C. A., Lu, Z. Y., Zaitsev, I., & Manuelidis, L. (1999). Microglial activation varies in different models of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol*, 73(6), 5089-5097.
- Baker, C. A., Martin, D., & Manuelidis, L. (2002). Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J Virol*, 76(21), 10905-10913.
- Ball, M. J. (1978). Topographic distribution of neurofibrillary tangles and granulovacuolar degeneration in hippocampal cortex of aging and demented patients. A quantitative study. *Acta Neuropathol*, 42(2), 73-80.
- Bamburg, J. R., & Bloom, G. S. (2009). Cytoskeletal pathologies of Alzheimer disease. *Cell Motil Cytoskeleton*, 66(8), 635-649.
- Barage, S. H., & Sonawane, K. D. (2015). Amyloid cascade hypothesis: Pathogenesis and therapeutic strategies in Alzheimer's disease. *Neuropeptides*, 52, 1-18.
- Barry, D. S., Pakan, J. M., & McDermott, K. W. (2014). Radial glial cells: key organisers in CNS development. *Int J Biochem Cell Biol*, 46, 76-79.

BIBLIOGRAFÍA

- Baurle, J., & Grusser-Cornehls, U. (1994). Axonal torpedoes in cerebellar Purkinje cells of two normal mouse strains during aging. *Acta Neuropathol*, *88*(3), 237-245.
- Beach, T. G., Adler, C. H., Sue, L. I., Vedders, L., Lue, L., White lji, C. L., Akiyama, H., Caviness, J. N., Shill, H. A., Sabbagh, M. N., Walker, D. G., & Arizona Parkinson's Disease, C. (2010). Multi-organ distribution of phosphorylated alpha-synuclein histopathology in subjects with Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, *119*(6), 689-702.
- Beach, T. G., Walker, R., & McGeer, E. G. (1989). Patterns of gliosis in Alzheimer's disease and aging cerebrum. *Glia*, *2*(6), 420-436.
- Beck, J., Collinge, J., & Mead, S. (2012). Prion protein gene M232R variation is probably an uncommon polymorphism rather than a pathogenic mutation. *Brain*, *135*(Pt 2), e209; author reply e210.
- Beringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haik, S., Vilotte, J. L., Fontes, M., & Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLoS One*, *3*(1), e1419.
- Bertram, L., Lill, C. M., & Tanzi, R. E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron*, *68*(2), 270-281.
- Betmouni, S., Perry, V. H., & Gordon, J. L. (1996). Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience*, *74*(1), 1-5.
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M., & Verderio, C. (2005). Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *J Immunol*, *174*(11), 7268-7277.
- Billette de Villemeur, T., & Pradel, A. (1994). [Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. Lessons from cases secondary to extracted growth hormone in France]. *Transfus Clin Biol*, *1*(5), 333-337.
- Bishop, M. T., Hart, P., Aitchison, L., Baybutt, H. N., Plinston, C., Thomson, V., Tuzi, N. L., Head, M. W., Ironside, J. W., Will, R. G., & Manson, J. C. (2006). Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol*, *5*(5), 393-398.
- Bisht, K., Sharma, K. P., Lecours, C., Sanchez, M. G., El Hajj, H., Milior, G., Olmos-Alonso, A., Gomez-Nicola, D., Luheshi, G., Vallieres, L., Branchi, I., Maggi, L., Limatola, C., Butovsky, O., & Tremblay, M. E. (2016). Dark microglia: A new phenotype predominantly associated with pathological states. *Glia*, *64*(5), 826-839.
- Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *39*(1), 3-18.

BIBLIOGRAFÍA

- Boillee, S., Vande Velde, C., & Cleveland, D. W. (2006). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron*, *52*(1), 39-59.
- Boillee, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C. S., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Kassiotis, G., Kollias, G., & Cleveland, D. W. (2006). Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science*, *312*(5778), 1389-1392.
- Boluda, S., Iba, M., Zhang, B., Raible, K. M., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2015). Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains. *Acta Neuropathol*, *129*(2), 221-237.
- Bonifati, D. M., & Kishore, U. (2007). Role of complement in neurodegeneration and neuroinflammation. *Mol Immunol*, *44*(5), 999-1010.
- Bons, N., Mestre-Frances, N., Charnay, Y., & Tagliavini, F. (1996). Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *Lancet*, *348*(9019), 55.
- Borner, R., Bento-Torres, J., Souza, D. R., Sadala, D. B., Trevia, N., Farias, J. A., Lins, N., Passos, A., Quinteiros, A., Diniz, J. A., Perry, V. H., Vasconcelos, P. F., Cunningham, C., & Picanco-Diniz, C. W. (2011). Early behavioral changes and quantitative analysis of neuropathological features in murine prion disease: stereological analysis in the albino Swiss mice model. *Prion*, *5*(3), 215-227.
- Borrell-Pages, M., Zala, D., Humbert, S., & Saudou, F. (2006). Huntington's disease: from huntingtin function and dysfunction to therapeutic strategies. *Cell Mol Life Sci*, *63*(22), 2642-2660.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H., & Del Tredici, K. (2006). Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, *112*(4), 389-404.
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, *82*(4), 239-259.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rub, U., de Vos, R. A., Jansen Steur, E. N., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, *24*(2), 197-211.
- Brambilla, L., Martorana, F., & Rossi, D. (2013). Astrocyte signaling and neurodegeneration: new insights into CNS disorders. *Prion*, *7*(1), 28-36.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W. H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E. J., & Bethea, J. R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces

BIBLIOGRAFÍA

- inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J Exp Med*, 202(1), 145-156.
- Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V. I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S. R., & Bethea, J. R. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol*, 182(5), 2628-2640.
- Brandel, J. P., Heath, C. A., Head, M. W., Levavasseur, E., Knight, R., Laplanche, J. L., Langeveld, J. P., Ironside, J. W., Hauw, J. J., Mackenzie, J., Alperovitch, A., Will, R. G., & Haik, S. (2009). Variant Creutzfeldt-Jakob disease in France and the United Kingdom: Evidence for the same agent strain. *Ann Neurol*, 65(3), 249-256.
- Brandel, J. P., & Knight, R. (2018). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol*, 153, 191-205.
- Brettschneider, J., Del Tredici, K., Toledo, J. B., Robinson, J. L., Irwin, D. J., Grossman, M., Suh, E., Van Deerlin, V. M., Wood, E. M., Baek, Y., Kwong, L., Lee, E. B., Elman, L., McCluskey, L., Fang, L., Feldengut, S., Ludolph, A. C., Lee, V. M., Braak, H., & Trojanowski, J. Q. (2013). Stages of pTDP-43 pathology in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*, 74(1), 20-38.
- Brown, D. A., Bruce, M. E., & Fraser, J. R. (2003). Comparison of the neuropathological characteristics of bovine spongiform encephalopathy (BSE) and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in mice. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 29(3), 262-272.
- Brown, D. R. (1999). Prion protein peptide neurotoxicity can be mediated by astrocytes. *J Neurochem*, 73(3), 1105-1113.
- Brown, D. R. (2001). Microglia and prion disease. *Microsc Res Tech*, 54(2), 71-80.
- Brown, D. R., Schmidt, B., & Kretzschmar, H. A. (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, 380(6572), 345-347.
- Brown, P., Brandel, J. P., Sato, T., Nakamura, Y., MacKenzie, J., Will, R. G., Ladogana, A., Pocchiari, M., Leschek, E. W., & Schonberger, L. B. (2012). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease, final assessment. *Emerg Infect Dis*, 18(6), 901-907.
- Brown, P., Rodgers-Johnson, P., Cathala, F., Gibbs, C. J., Jr., & Gajdusek, D. C. (1984). Creutzfeldt-Jakob disease of long duration: clinicopathological characteristics, transmissibility, and differential diagnosis. *Ann Neurol*, 16(3), 295-304.

BIBLIOGRAFÍA

- Bruce, M. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, 49(4):822-38.
- Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., & Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 343(1306), 405-411.
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389(6650), 498-501.
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73(7), 1339-1347.
- Buffo, A., & Rossi, F. (2013). Origin, lineage and function of cerebellar glia. *Prog Neurobiol*, 109, 42-63.
- Burda, J. E., & Sofroniew, M. V. (2014). Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*, 81(2), 229-248.
- Burns, A., Jacoby, R., & Levy, R. (1990). Psychiatric phenomena in Alzheimer's disease. I: Disorders of thought content. *Br J Psychiatry*, 157, 72-76, 92-74.
- Bushong, E. A., Martone, M. E., Jones, Y. Z., & Ellisman, M. H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J Neurosci*, 22(1), 183-192.
- Calderon-Garciduenas, A. L., & Duyckaerts, C. (2017). Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*, 145, 325-337.
- Calero, M., Gomez-Ramos, A., Calero, O., Soriano, E., Avila, J., & Medina, M. (2015). Additional mechanisms conferring genetic susceptibility to Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*, 9, 138.
- Cali, I., Castellani, R., Yuan, J., Al-Shekhlee, A., Cohen, M. L., Xiao, X., Molerés, F. J., Parchi, P., Zou, W. Q., & Gambetti, P. (2006). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease revisited. *Brain*, 129(Pt 9), 2266-2277.
- Cali, I., Miller, C. J., Parisi, J. E., Geschwind, M. D., Gambetti, P., & Schonberger, L. B. (2015). Distinct pathological phenotypes of Creutzfeldt-Jakob disease in recipients of prion-contaminated growth hormone. *Acta Neuropathol Commun*, 3, 37.
- Cano, R., Sierra, M. J., & Tello, O. (2015). Protocolos de la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Madrid. 110-128.

BIBLIOGRAFÍA

- Capellari, S., Strammiello, R., Saverioni, D., Kretzschmar, H., & Parchi, P. (2011). Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis. *Acta Neuropathol*, *121*(1), 21-37.
- Carroll, J. A., Race, B., Williams, K., Striebel, J., & Chesebro, B. (2018). Microglia Are Critical in Host Defense Against Prion Disease. *J Virol*, *92*(15)
- Carroll, J. A., Striebel, J. F., Rangel, A., Woods, T., Phillips, K., Peterson, K. E., Race, B., & Chesebro, B. (2016). Prion Strain Differences in Accumulation of PrP^{Sc} on Neurons and Glia Are Associated with Similar Expression Profiles of Neuroinflammatory Genes: Comparison of Three Prion Strains. *PLoS Pathog*, *12*(4), e1005551.
- Castle, A. R., & Gill, A. C. (2017). Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci*, *4*, 19.
- Cekanaviciute, E., & Buckwalter, M. S. (2016). Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics*, *13*(4), 685-701.
- Cicchetti, F., Lacroix, S., Cisbani, G., Vallieres, N., Saint-Pierre, M., St-Amour, I., Tolouei, R., Skepper, J. N., Hauser, R. A., Mantovani, D., Barker, R. A., & Freeman, T. B. (2014). Mutant huntingtin is present in neuronal grafts in Huntington disease patients. *Ann Neurol*, *76*(1), 31-42.
- Clavaguera, F., Akatsu, H., Fraser, G., Crowther, R. A., Frank, S., Hench, J., Probst, A., Winkler, D. T., Reichwald, J., Staufenbiel, M., Ghetti, B., Goedert, M., & Tolnay, M. (2013). Brain homogenates from human tauopathies induce tau inclusions in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(23), 9535-9540.
- Clavaguera, F., Bolmont, T., Crowther, R. A., Abramowski, D., Frank, S., Probst, A., Fraser, G., Stalder, A. K., Beibel, M., Staufenbiel, M., Jucker, M., Goedert, M., & Tolnay, M. (2009). Transmission and spreading of tauopathy in transgenic mouse brain. *Nat Cell Biol*, *11*(7), 909-913.
- Clavaguera, F., Hench, J., Lavenir, I., Schweighauser, G., Frank, S., Goedert, M., & Tolnay, M. (2014). Peripheral administration of tau aggregates triggers intracerebral tauopathy in transgenic mice. *Acta Neuropathol*, *127*(2), 299-301.
- Clewley, J. P., Kelly, C. M., Andrews, N., Vogliqi, K., Mallinson, G., Kaiser, M., Hilton, D. A., Ironside, J. W., Edwards, P., McCardle, L. M., Ritchie, D. L., Dabaghian, R., Ambrose, H. E., & Gill, O. N. (2009). Prevalence of disease related prion protein in anonymous tonsil specimens in Britain: cross sectional opportunistic survey. *BMJ*, *338*, b1442.

BIBLIOGRAFÍA

- Colombo, J. A., Gayol, S., Yanez, A., & Marco, P. (1997). Immunocytochemical and electron microscope observations on astroglial interlaminar processes in the primate neocortex. *J Neurosci Res*, *48*(4), 352-357.
- Colombo, J. A., Quinn, B., & Puissant, V. (2002). Disruption of astroglial interlaminar processes in Alzheimer's disease. *Brain Res Bull*, *58*(2), 235-242.
- Colombo, J. A., & Reisin, H. D. (2004). Interlaminar astroglia of the cerebral cortex: a marker of the primate brain. *Brain Res*, *1006*(1), 126-131.
- Colombo, J. A., Reisin, H. D., Jones, M., & Bentham, C. (2005). Development of interlaminar astroglial processes in the cerebral cortex of control and Down's syndrome human cases. *Exp Neurol*, *193*(1), 207-217.
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, *383*(6602), 685-690.
- Concha-Marambio, L., Pritzkow, S., Moda, F., Tagliavini, F., Ironside, J. W., Schulz, P. E., & Soto, C. (2016). Detection of prions in blood from patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Sci Transl Med*, *8*(370), 370ra183.
- Cousens, S. N., Zeidler, M., Esmonde, T. F., De Silva, R., Wilesmith, J. W., Smith, P. G., & Will, R. G. (1997). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: analysis of epidemiological surveillance data for 1970-96. *BMJ*, *315*(7105), 389-395.
- Cremades, N., Cohen, S. I., Deas, E., Abramov, A. Y., Chen, A. Y., Orte, A., Sandal, M., Clarke, R. W., Dunne, P., Aprile, F. A., Bertocini, C. W., Wood, N. W., Knowles, T. P., Dobson, C. M., & Klenerman, D. (2012). Direct observation of the interconversion of normal and toxic forms of alpha-synuclein. *Cell*, *149*(5), 1048-1059.
- Crespo, I., Roomp, K., Jurkowski, W., Kitano, H., & del Sol, A. (2012). Gene regulatory network analysis supports inflammation as a key neurodegeneration process in prion disease. *BMC Syst Biol*, *6*, 132.
- Creutzfeldt, H.. (1920). Über eine egenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems. *Zges Neurol Psychiat*, *51*, 1-18.
- Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*, *227*(5258), 561-563.
- Croes, E. A., Roks, G., Jansen, G. H., Nijssen, P. C., & van Duijn, C. M. (2002). Creutzfeldt-Jakob disease 38 years after diagnostic use of human growth hormone. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *72*(6), 792-793.
- Cronier, S., Laude, H., & Peyrin, J. M. (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(33), 12271-12276.

BIBLIOGRAFÍA

- Crotti, A., & Glass, C. K. (2015). The choreography of neuroinflammation in Huntington's disease. *Trends Immunol*, 36(6), 364-373.
- Chan-Palay, V., & Palay, S. L. (1972). The form of velate astrocytes in the cerebellar cortex of monkey and rat: high voltage electron microscopy of rapid Golgi preparations. *Z Anat Entwicklungsgesch*, 138(1), 1-19.
- Chouraki, V., & Seshadri, S. (2014). Genetics of Alzheimer's disease. *Adv Genet*, 87, 245-294.
- Chung, W. S., Clarke, L. E., Wang, G. X., Stafford, B. K., Sher, A., Chakraborty, C., Joung, J., Foo, L. C., Thompson, A., Chen, C., Smith, S. J., & Barres, B. A. (2013). Astrocytes mediate synapse elimination through MEGF10 and MERTK pathways. *Nature*, 504(7480), 394-400.
- Chung, W. S., Welsh, C. A., Barres, B. A., & Stevens, B. (2015). Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat Neurosci*, 18(11), 1539-1545.
- Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J. V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D. R., Dustin, M. L., & Gan, W. B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8(6), 752-758.
- Davies, P., & Maloney, A. J. (1976). Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *Lancet*, 2(8000), 1403.
- de Marco, M. F., Linehan, J., Gill, O. N., Clewley, J. P., & Brandner, S. (2010). Large-scale immunohistochemical examination for lymphoreticular prion protein in tonsil specimens collected in Britain. *J Pathol*, 222(4), 380-387.
- Delaere, P., Duyckaerts, C., He, Y., Piette, F., & Hauw, J. J. (1991). Subtypes and differential laminar distributions of beta A4 deposits in Alzheimer's disease: relationship with the intellectual status of 26 cases. *Acta Neuropathol*, 81(3), 328-335.
- Deleon, J., & Miller, B. L. (2018). Frontotemporal dementia. *Handb Clin Neurol*, 148, 409-430.
- Delisle, M. B., Fabre, N., Rochiccioli, P., Doerr-Schott, J., Rumeau, J. L., & Bes, A. (1993). [Creutzfeldt-Jakob disease after treatment with human extracted growth hormone. A clinicopathological study]. *Rev Neurol (Paris)*, 149(10), 524-527.
- Derecki, N. C., Katzmarski, N., Kipnis, J., & Meyer-Luehmann, M. (2014). Microglia as a critical player in both developmental and late-life CNS pathologies. *Acta Neuropathol*, 128(3), 333-345.
- DeWitt, D. A., Perry, G., Cohen, M., Doller, C., & Silver, J. (1998). Astrocytes regulate microglial phagocytosis of senile plaque cores of Alzheimer's disease. *Exp Neurol*, 149(2), 329-340.

BIBLIOGRAFÍA

- Di Fede, G., Catania, M., Maderna, E., Ghidoni, R., Benussi, L., Tonoli, E., Giaccone, G., Moda, F., Paterlini, A., Campagnani, I., Sorrentino, S., Colombo, L., Kubis, A., Bistaffa, E., Ghetti, B., & Tagliavini, F. (2018). Molecular subtypes of Alzheimer's disease. *Sci Rep*, 8(1), 3269.
- Diack, A. B., Head, M. W., McCutcheon, S., Boyle, A., Knight, R., Ironside, J. W., Manson, J. C., & Will, R. G. (2014). Variant CJD. 18 years of research and surveillance. *Prion*, 8(4), 286-295.
- Diack, A. B., Ritchie, D., Bishop, M., Pinion, V., Brandel, J. P., Haik, S., Tagliavini, F., Van Duijn, C., Belay, E. D., Gambetti, P., Schonberger, L. B., Piccardo, P., Will, R. G., & Manson, J. C. (2012). Constant transmission properties of variant Creutzfeldt-Jakob disease in 5 countries. *Emerg Infect Dis*, 18(10), 1574-1579.
- Dickson, D. W. (2012). Parkinson's disease and parkinsonism: neuropathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(8).
- Dickson, D. W., Braak, H., Duda, J. E., Duyckaerts, C., Gasser, T., Halliday, G. M., Hardy, J., Leverenz, J. B., Del Tredici, K., Wszolek, Z. K., & Litvan, I. (2009). Neuropathological assessment of Parkinson's disease: refining the diagnostic criteria. *Lancet Neurol*, 8(12), 1150-1157.
- Diedrich, J. F., Bendheim, P. E., Kim, Y. S., Carp, R. I., & Haase, A. T. (1991). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(2), 375-379.
- Dimou, L. & Gallo, V. NG2-glia and their functions in the central nervous system. *Glia* 63, 1429–1451 (2015).
- DiSabato, D. J., Quan, N., & Godbout, J. P. (2016). Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*, 139 Suppl 2, 136-153.
- Doherty, K. M., Silveira-Moriyama, L., Parkkinen, L., Healy, D. G., Farrell, M., Mencacci, N. E., Ahmed, Z., Brett, F. M., Hardy, J., Quinn, N., Counihan, T. J., Lynch, T., Fox, Z. V., Revesz, T., Lees, A. J., & Holton, J. L. (2013). Parkin disease: a clinicopathologic entity? *JAMA Neurol*, 70(5), 571-579.
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., & Zhang, H. L. (2017). Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Mol Neurobiol*, 54(10), 7567-7584.
- Duffy, P., Wolf, J., Collins, G., DeVoe, A. G., Streeten, B., & Cowen, D. (1974). Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, 290(12), 692-693.

BIBLIOGRAFÍA

- Duyckaerts, C., Delatour, B., & Potier, M. C. (2009). Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, *118*(1), 5-36.
- Dzamba, D., Harantova, L., Butenko, O., & Anderova, M. (2016). Glial Cells - The Key Elements of Alzheimer s Disease. *Curr Alzheimer Res*, *13*(8), 894-911.
- Eisele, Y. S., Bolmont, T., Heikenwalder, M., Langer, F., Jacobson, L. H., Yan, Z. X., Roth, K., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Walker, L. C., & Jucker, M. (2009). Induction of cerebral beta-amyloidosis: intracerebral versus systemic Abeta inoculation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(31), 12926-12931.
- Eisenberg, D., & Jucker, M. (2012). The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*, *148*(6), 1188-1203.
- Ekdahl, C. T., Kokaia, Z., & Lindvall, O. (2009). Brain inflammation and adult neurogenesis: the dual role of microglia. *Neuroscience*, *158*(3), 1021-1029.
- Elsayed, M., & Magistretti, P. J. (2015). A New Outlook on Mental Illnesses: Glial Involvement Beyond the Glue. *Front Cell Neurosci*, *9*, 468.
- Emsley, J. G., & Macklis, J. D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol*, *2*(3), 175-186.
- Estes, M. L., & McAllister, A. K. (2014). Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol*, *24*(6), 623-630.
- EUROCID (European Creutzfeldt-Jakob Disease Surveillance Network). Surveillance Data - CID International Surveillance Network. Disponible en: <http://www.eurocid.ed.ac.uk/surveillance%20data%201.html>[10 febrero 2019]
- Feig, S. L., & Haberly, L. B. (2011). Surface-associated astrocytes, not endfeet, form the glia limitans in posterior piriform cortex and have a spatially distributed, not a domain, organization. *J Comp Neurol*, *519*(10), 1952-1969.
- Fernandez-Borges, N., Erana, H., Elezgarai, S. R., Harrathi, C., Gayosso, M., & Castilla, J. (2013). Infectivity versus Seeding in Neurodegenerative Diseases Sharing a Prion-Like Mechanism. *Int J Cell Biol*, *2013*, 583498.
- Ferrer, I. (2017). Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol*, *27*(5), 645-674.
- Filiou, M. D., Arefin, A. S., Moscato, P., & Graeber, M. B. (2014). 'Neuroinflammation' differs categorically from inflammation: transcriptomes of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, schizophrenia and inflammatory diseases compared. *Neurogenetics*, *15*(3), 201-212.

BIBLIOGRAFÍA

- Fowler, M., & Robertson, E. G. (1959). Observations on kuru. III. Pathological features in five cases. *Australas Ann Med*, 8(1), 16-26.
- Franceschini, A., Strammiello, R., Capellari, S., Giese, A., & Parchi, P. (2018a). Regional pattern of microgliosis in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in relation to phenotypic variants and disease progression. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 44(6), 574-589.
- Franceschini, A., Strammiello, R., Capellari, S., Giese, A., & Parchi, P. (2018b). Regional pattern of microgliosis in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in relation to phenotypic variants and disease progression. *Neuropathol Appl Neurobiol*.
- Fraser, H. (1979). The Pathogenesis and Pathology of Scrapie. In: Tyrrell D.A.J. (eds) *Aspects of Slow and Persistent Virus Infections. New Perspectives in Clinical Microbiology*, vol 2. Springer, Dordrecht.
- Fraser, H. (1982). Neuronal spread of scrapie agent and targeting of lesions within the retino-tectal pathway. *Nature*, 295(5845), 149-150.
- Fraser, H., Pearson, G. R., McConnell, I., Bruce, M. E., Wyatt, J. M., & Gruffydd-Jones, T. J. (1994). Transmission of feline spongiform encephalopathy to mice. *Vet Rec*, 134(17), 449.
- Fritschi, S. K., Cintron, A., Ye, L., Mahler, J., Buhler, A., Baumann, F., Neumann, M., Nilsson, K. P., Hammarstrom, P., Walker, L. C., & Jucker, M. (2014). Abeta seeds resist inactivation by formaldehyde. *Acta Neuropathol*, 128(4), 477-484.
- Frontzek, K., Lutz, M. I., Aguzzi, A., Kovacs, G. G., & Budka, H. (2016). Amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy are frequent in iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease after dural grafting. *Swiss Med Wkly*, 146, w14287.
- Frosh, A., Smith, L. C., Jackson, C. J., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., & Collinge, J. (2004). Analysis of 2000 consecutive UK tonsillectomy specimens for disease-related prion protein. *Lancet*, 364(9441), 1260-1262.
- Fukutani, Y., Cairns, N. J., Rossor, M. N., & Lantos, P. L. (1996). Purkinje cell loss and astrocytosis in the cerebellum in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 214(1), 33-36.
- Gajdusek, D. C., & Zigas, V. (1957). Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*, 257(20), 974-978.

BIBLIOGRAFÍA

- Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alshekhlee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M. A., Gonzalez-Romero, D., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Marder, K., Harris, C., Burke, J. R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D. W., Soto, C., Hulette, C. M., Mastrianni, J. A., Kong, Q., & Zou, W. Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*, *63*(6), 697-708.
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., & Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull*, *66*, 213-239.
- Garcés, M., Toledano, A., Badiola, J. J., & Monzon, M. (2016). Morphological Changes of Glia in Prion and a Prion-Like Disorder. *J Alzheimers Neurodegener Dis* *2: 005*.
- Gatz, M., Reynolds, C. A., Fratiglioni, L., Johansson, B., Mortimer, J. A., Berg, S., Fiske, A., & Pedersen, N. L. (2006). Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry*, *63*(2), 168-174.
- Georgsson, G., Gisladdottir, E., & Arnadottir, S. (1993). Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J Comp Pathol*, *108*(3), 229-240.
- Gerstmann, J. S. E., Scheinker, I., (1936). Über eine eigenartige hereditärfamiliäre Erkrankung des Zentralnervensystems. Zugleich ein Beitrag zur Frage des vorzeitigen lokalen Alterns. *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* *154*, 736–776.
- Ghetti, B., Aylea C. J., Muller, J., Studies on the Purkinje cell degeneration (PCD) mutant: primary pathology and transneuronal changes. *J NeuropatholExp Neurol* 1978; *37*:617.
- Ghetti, B., Piccardo, P., Spillantini, M. G., Ichimiya, Y., Porro, M., Perini, F., Kitamoto, T., Tateishi, J., Seiler, C., Frangione, B., Bugiani, O., Giaccone, G., Prelli, F., Goedert, M., Dlouhy, S. R., & Tagliavini, F. (1996). Vascular variant of prion protein cerebral amyloidosis with tau-positive neurofibrillary tangles: the phenotype of the stop codon 145 mutation in PRNP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(2), 744-748.
- Ghetti, B., Piccardo, P., & Zanusso, G. (2018). Dominantly inherited prion protein cerebral amyloidoses - a modern view of Gerstmann-Straussler-Scheinker. *Handb Clin Neurol*, *153*, 243-269.
- Ghosh, R., & Tabrizi, S. J. (2018). Huntington disease. *Handb Clin Neurol*, *147*, 255-278.
- Ghoshal, N., Perry, A., McKeel, D., Schmidt, R. E., Carter, D., Norton, J., Zou, W. Q., Xiao, X., Puoti, G., Notari, S., Gambetti, P., Morris, J. C., & Cairns, N. J. (2015). Variably Protease-sensitive Prionopathy in an Apparent Cognitively Normal 93-Year-Old. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *29*(2), 173-176.

BIBLIOGRAFÍA

- Giannakopoulos, P., von Gunten, A., Kovari, E., Gold, G., Herrmann, F. R., Hof, P. R., & Bouras, C. (2007). Stereological analysis of neuropil threads in the hippocampal formation: relationships with Alzheimer's disease neuronal pathology and cognition. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33(3), 334-343.
- Gibb, W. R., & Lees, A. J. (1988). The relevance of the Lewy body to the pathogenesis of idiopathic Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 51(6), 745-752.
- Gibson, P. H., & Tomlinson, B. E. (1977). Numbers of Hirano bodies in the hippocampus of normal and demented people with Alzheimer's disease. *J Neurol Sci*, 33(1-2), 199-206.
- Giese, A., Brown, D. R., Groschup, M. H., Feldmann, C., Haist, I., & Kretzschmar, H. A. (1998). Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol*, 8(3), 449-457.
- Gill, O. N., Spencer, Y., Richard-Loendt, A., Kelly, C., Dabaghian, R., Boyes, L., Linehan, J., Simmons, M., Webb, P., Bellerby, P., Andrews, N., Hilton, D. A., Ironside, J. W., Beck, J., Poulter, M., Mead, S., & Brandner, S. (2013). Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey. *BMJ*, 347, f5675.
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of microglia: current concepts and past controversies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7(8), a020537.
- Gitcho, M. A., Baloh, R. H., Chakraborty, S., Mayo, K., Norton, J. B., Levitch, D., Hatanpaa, K. J., White, C. L., 3rd, Bigio, E. H., Caselli, R., Baker, M., Al-Lozi, M. T., Morris, J. C., Pestronk, A., Rademakers, R., Goate, A. M., & Cairns, N. J. (2008). TDP-43 A315T mutation in familial motor neuron disease. *Ann Neurol*, 63(4), 535-538.
- Goate, A., Chartier-Harlin, M. C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., & et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311), 704-706.
- Goldfarb, L. G., Petersen, R. B., Tabaton, M., Brown, P., LeBlanc, A. C., Montagna, P., Cortelli, P., Julien, J., Vital, C., Pendelbury, W. W., & et al. (1992). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: disease phenotype determined by a DNA polymorphism. *Science*, 258(5083), 806-808.
- Gomez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S., & Perry, V. H. (2013). Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*, 33(6), 2481-2493.
- Gomi, H., Yokoyama, T., Fujimoto, K., Ikeda, T., Katoh, A., Itoh, T., & Itohara, S. (1995). Mice devoid of the glial fibrillary acidic protein develop normally and are susceptible to scrapie prions. *Neuron*, 14(1), 29-41.

BIBLIOGRAFÍA

- Graeber, M. B., Bise, K., Mehraein, P. (1994) CR3/43, a marker for activated human microglia: application to diagnostic neuropathology. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* ;20:406–8.
- Graeber, M. B., (2010). Changing face of microglia. *Science*, 330(6005), 783-788. Graeber, M. B., & Streit, W. J. (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, 119(1), 89-105.
- Grammas, P. (2011). Neurovascular dysfunction, inflammation and endothelial activation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, 8, 26.
- Greenberg, S. M., & Vonsattel, J. P. (1997). Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy. Sensitivity and specificity of cortical biopsy. *Stroke*, 28(7), 1418-1422.
- Gu, X. L., Long, C. X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., & Cai, H. (2010). Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol Brain*, 3, 12.
- Guerriero, F., Sgarlata, C., Francis, M., Maurizi, N., Faragli, A., Perna, S., Rondanelli, M., Rollone, M., & Ricevuti, G. (2017). Neuroinflammation, immune system and Alzheimer disease: searching for the missing link. *Aging Clin Exp Res*, 29(5), 821-831.
- Guillot-Sestier, M. V., & Town, T. (2018). Let's make microglia great again in neurodegenerative disorders. *J Neural Transm (Vienna)*, 125(5), 751-770.
- Guo, J. L., Covell, D. J., Daniels, J. P., Iba, M., Stieber, A., Zhang, B., Riddle, D. M., Kwong, L. K., Xu, Y., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2013). Distinct alpha-synuclein strains differentially promote tau inclusions in neurons. *Cell*, 154(1), 103-117.
- Gutkunst, C. A., Li, S. H., Yi, H., Mulroy, J. S., Kuemmerle, S., Jones, R., Rye, D., Ferrante, R. J., Hersch, S. M., & Li, X. J. (1999). Nuclear and neuropil aggregates in Huntington's disease: relationship to neuropathology. *J Neurosci*, 19(7), 2522-2534.
- Haik, S., & Brandel, J. P. (2011). Biochemical and strain properties of CJD prions: complexity versus simplicity. *J Neurochem*, 119(2), 251-261.
- Halliday, G. M., McRitchie, D. A., Macdonald, V., Double, K. L., Trent, R. J., & McCusker, E. (1998). Regional specificity of brain atrophy in Huntington's disease. *Exp Neurol*, 154(2), 663-672.
- Hamaguchi, T., Taniguchi, Y., Sakai, K., Kitamoto, T., Takao, M., Murayama, S., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Shimizu, H., Kakita, A., Takahashi, H., Suzuki, H., Naiki, H., Sanjo, N., Mizusawa, H., & Yamada, M. (2016). Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial Abeta deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*, 132(2), 313-315.

BIBLIOGRAFÍA

- Hamby, M. E., Coppola, G., Ao, Y., Geschwind, D. H., Khakh, B. S., & Sofroniew, M. V. (2012). Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *J Neurosci*, *32*(42), 14489-14510.
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, *256*(5054), 184-185.
- Harrington, D. L., Smith, M. M., Zhang, Y., Carlozzi, N. E., Paulsen, J. S., & Group, P.-H. I. o. t. H. S. (2012). Cognitive domains that predict time to diagnosis in prodromal Huntington disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *83*(6), 612-619.
- Hartsough, G. R., & Burger, D. (1965). Encephalopathy of mink. I. Epizootiologic and clinical observations. *J Infect Dis*, *115*(4), 387-392.
- Haines, E. H. (2014). PRINCIPIOS DE NEUROCIENCIA: Aplicaciones básicas y clínicas / Duane E. Haines (4a. ed.) Elsevier España, S.L.
- Head, M. W. (2013). Human prion diseases: molecular, cellular and population biology. *Neuropathology*, *33*(3), 221-236.
- Head, M. W., & Ironside, J. W. (2012). Review: Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *38*(4), 296-310.
- Head, M. W., Yull, H. M., Ritchie, D. L., Langeveld, J. P., Fletcher, N. A., Knight, R. S., & Ironside, J. W. (2013). Variably protease-sensitive prionopathy in the UK: a retrospective review 1991-2008. *Brain*, *136*(Pt 4), 1102-1115.
- Heneka, M. T., Carson, M. J., El Khoury, J., Landreth, G. E., Brosseron, F., Feinstein, D. L., Jacobs, A. H., Wyss-Coray, T., Vitorica, J., Ransohoff, R. M., Herrup, K., Frautschy, S. A., Finsen, B., Brown, G. C., Verkhratsky, A., Yamanaka, K., Koistinaho, J., Latz, E., Halle, A., Petzold, G. C., Town, T., Morgan, D., Shinohara, M. L., Perry, V. H., Holmes, C., Bazan, N. G., Brooks, D. J., Hunot, S., Joseph, B., Deigendesch, N., Garaschuk, O., Boddeke, E., Dinarello, C. A., Breitner, J. C., Cole, G. M., Golenbock, D. T., & Kummer, M. P. (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*, *14*(4), 388-405.
- Heppner, F. L., Ransohoff, R. M., & Becher, B. (2015). Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*, *16*(6), 358-372.
- Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, *62*(9), 1377-1391.
- Hernandez, R. S., Sarasa, R., Toledano, A., Badiola, J. J., & Monzon, M. (2014). Morphological approach to assess the involvement of astrocytes in prion propagation. *Cell Tissue Res*, *358*(1), 57-63.

BIBLIOGRAFÍA

- Hilgetag, C. C., & Barbas, H. (2009). Are there ten times more glia than neurons in the brain? *Brain Struct Funct*, 213(4-5), 365-366.
- Hilton, D. A., Ghani, A. C., Conyers, L., Edwards, P., McCardle, L., Ritchie, D., Penney, M., Hegazy, D., & Ironside, J. W. (2004). Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples. *J Pathol*, 203(3), 733-739.
- Hill, A. F., Butterworth, R. J., Joiner, S., Jackson, G., Rossor, M. N., Thomas, D. J., Frosh, A., Tolley, N., Bell, J. E., Spencer, M., King, A., Al-Sarraj, S., Ironside, J. W., Lantos, P. L., & Collinge, J. (1999). Investigation of variant Creutzfeldt-Jakob disease and other human prion diseases with tonsil biopsy samples. *Lancet*, 353(9148), 183-189.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., & Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389(6650), 448-450, 526.
- Hill, A. F., Joiner, S., Beck, J. A., Campbell, T. A., Dickinson, A., Poulter, M., Wadsworth, J. D., & Collinge, J. (2006). Distinct glycoform ratios of protease resistant prion protein associated with PRNP point mutations. *Brain*, 129(Pt 3), 676-685.
- Hill, A. F., Joiner, S., Wadsworth, J. D., Sidle, K. C., Bell, J. E., Budka, H., Ironside, J. W., & Collinge, J. (2003). Molecular classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain*, 126(Pt 6), 1333-1346.
- Hirano, A. (1994). Hirano bodies and related neuronal inclusions. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 20(1), 3-11.
- Hirano, A., Dembitzer, H. M., Kurland, L. T., & Zimmerman, H. M. (1968). The fine structure of some intraganglionic alterations. Neurofibrillary tangles, granulovacuolar bodies and "rod-like" structures as seen in Guam amyotrophic lateral sclerosis and parkinsonism-dementia complex. *J Neuropathol Exp Neurol*, 27(2), 167-182.
- Hirsch, E. C., Vyas, S., & Hunot, S. (2012). Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord*, 18 Suppl 1, S210-212.
- Hoogeveen, A. T., Willemsen, R., Meyer, N., de Rooij, K. E., Roos, R. A., van Ommen, G. J., & Galjaard, H. (1993). Characterization and localization of the Huntington disease gene product. *Hum Mol Genet*, 2(12), 2069-2073.
- Hoozemans, J. J., Rozemuller, A. J., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., & van Gool, W. A. (2011). Neuroinflammation in Alzheimer's disease wanes with age. *J Neuroinflammation*, 8, 171.

BIBLIOGRAFÍA

- Hoozemans, J. J., van Haastert, E. S., Veerhuis, R., Arendt, T., Scheper, W., Eikelenboom, P., & Rozemuller, A. J. (2005). Maximal COX-2 and ppRb expression in neurons occurs during early Braak stages prior to the maximal activation of astrocytes and microglia in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*, *2*, 27.
- Hope, J., Ritchie, L., Farquhar, C., Somerville, R., & Hunter, N. (1989). Bovine spongiform encephalopathy: a scrapie-like disease of British cattle. *Prog Clin Biol Res*, *317*, 659-667.
- Hortobagyi, T., & Cairns, N. J. (2017). Amyotrophic lateral sclerosis and non-tau frontotemporal lobar degeneration. *Handb Clin Neurol*, *145*, 369-381.
- Hyman, B. T., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Carrillo, M. C., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Thies, B., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V., & Montine, T. J. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *8*(1), 1-13.
- Iaccarino, L., Moresco, R. M., Presotto, L., Bugiani, O., Iannaccone, S., Giaccone, G., Tagliavini, F., & Perani, D. (2018). An In Vivo (11)C-(R)-PK11195 PET and In Vitro Pathology Study of Microglia Activation in Creutzfeldt-Jakob Disease. *Mol Neurobiol*, *55*(4), 2856-2868.
- Iadecola, C., & Nedergaard, M. (2007). Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*, *10*(11), 1369-1376.
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Virology*, *8*, 493.
- Instituto de Salud Carlos III (ISCIII). Encefalopatías Espongiformes Transmisibles Humanas. Sistema de Vigilancia de las EET en España. Disponible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-enfermedades/fd-encefalopatas-espongiformes-transmisibles-humanas/sistema-vigilancia-eet-espana.shtml> [29 Enero 2019]
- Ironside, J., Ritchie, D., Peden, A., & Head, M. . (2014). Human prion diseases. In G. Kovacs (Ed.), *Neuropathology of Neurodegenerative Diseases: A Practical Guide*, (pp. 176-194). Cambridge: Cambridge University Press.
- Ironside, J. W., Ritchie, D. L., & Head, M. W. (2017). Prion diseases. *Handb Clin Neurol*, *145*, 393-403.
- Irwin, D. J., White, M. T., Toledo, J. B., Xie, S. X., Robinson, J. L., Van Deerlin, V., Lee, V. M., Leverenz, J. B., Montine, T. J., Duda, J. E., Hurtig, H. I., & Trojanowski, J. Q. (2012). Neuropathologic substrates of Parkinson disease dementia. *Ann Neurol*, *72*(4), 587-598.

BIBLIOGRAFÍA

- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., & Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*, *24*(3), 173-182.
- Iturria-Medina, Y., & Evans, A. C. (2015). On the central role of brain connectivity in neurodegenerative disease progression. *Front Aging Neurosci*, *7*, 90.
- Jakob, A. (1921 (a)). Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde (spastische Pseudosclerose-Encephalopathie mit disseminierten Degenerationsherden). *Deutsch Z Nervenheilk*, *70*, 132-146.
- Jakob, A. (1921 (b)). Über eine der multiplen Sklerose klinisch nahestehende Erkrankung des Centralnervensystems (spastische Pseudosklerose) mit bemerkenswertem anatomischen Befunde. *Med Klin*, *13*, 372-376.
- Jansen, C., Parchi, P., Capellari, S., Vermeij, A. J., Corrado, P., Baas, F., Strammiello, R., van Gool, W. A., van Swieten, J. C., & Rozemuller, A. J. (2010). Prion protein amyloidosis with divergent phenotype associated with two novel nonsense mutations in PRNP. *Acta Neuropathol*, *119*(2), 189-197.
- Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J. D., Nicoll, A. J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A. S., Rudge, P., Collinge, J., & Brandner, S. (2015). Evidence for human transmission of amyloid-beta pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*, *525*(7568), 247-250.
- Jayadev, S., Nochlin, D., Poorkaj, P., Steinbart, E. J., Mastrianni, J. A., Montine, T. J., Ghetti, B., Schellenberg, G. D., Bird, T. D., & Leverenz, J. B. (2011). Familial prion disease with Alzheimer disease-like tau pathology and clinical phenotype. *Ann Neurol*, *69*(4), 712-720.
- Jeon, I., Cicchetti, F., Cisbani, G., Lee, S., Li, E., Bae, J., Lee, N., Li, L., Im, W., Kim, M., Kim, H. S., Oh, S. H., Kim, T. A., Ko, J. J., Aube, B., Oueslati, A., Kim, Y. J., & Song, J. (2016). Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein. *Acta Neuropathol*, *132*(4), 577-592.
- Jiang, T., & Cadenas, E. (2014). Astrocytic metabolic and inflammatory changes as a function of age. *Aging Cell*, *13*(6), 1059-1067.
- Josephs, K. A., Murray, M. E., Whitwell, J. L., Parisi, J. E., Petrucelli, L., Jack, C. R., Petersen, R. C., & Dickson, D. W. (2014). Staging TDP-43 pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, *127*(3), 441-450.

BIBLIOGRAFÍA

- Jucker, M., & Walker, L. C. (2018). Propagation and spread of pathogenic protein assemblies in neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, *21*(10), 1341-1349.
- Kalia, L. V., & Lang, A. E. (2015). Parkinson's disease. *Lancet*, *386*(9996), 896-912.
- Kane, M. D., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Schwarz, R. D., Roher, A. E., & Walker, L. C. (2000). Evidence for seeding of beta -amyloid by intracerebral infusion of Alzheimer brain extracts in beta -amyloid precursor protein-transgenic mice. *J Neurosci*, *20*(10), 3606-3611.
- Kaski, D., Mead, S., Hyare, H., Cooper, S., Jampana, R., Overell, J., Knight, R., Collinge, J., & Rudge, P. (2009). Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. *Lancet*, *374*(9707), 2128.
- Kaufman, S. K., Sanders, D. W., Thomas, T. L., Ruchinskas, A. J., Vaquer-Alicea, J., Sharma, A. M., Miller, T. M., & Diamond, M. I. (2016). Tau Prion Strains Dictate Patterns of Cell Pathology, Progression Rate, and Regional Vulnerability In Vivo. *Neuron*, *92*(4), 796-812.
- Kaufman, S. K., Thomas, T. L., Del Tredici, K., Braak, H., & Diamond, M. I. (2017). Characterization of tau prion seeding activity and strains from formaldehyde-fixed tissue. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 41.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., & Glabe, C. G. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, *300*(5618), 486-489.
- Kempuraj, D., Thangavel, R., Natteru, P. A., Selvakumar, G. P., Saeed, D., Zahoor, H., Zaheer, S., Iyer, S. S., & Zaheer, A. (2016). Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. *J Neurol Neurosurg Spine*, *1*(1).
- Kettenmann, H. (2007). Neuroscience: the brain's garbage men. *Nature*, *446*(7139), 987-989.
- Kettenmann, H., Kirchhoff, F., & Verkhratsky, A. (2013). Microglia: new roles for the synaptic stripper. *Neuron*, *77*(1), 10-18.
- Kettenmann, H., & Verkhratsky, A. (2008). Neuroglia: the 150 years after. *Trends Neurosci*, *31*(12), 653-659.
- Khoo, T. K., Yarnall, A. J., Duncan, G. W., Coleman, S., O'Brien, J. T., Brooks, D. J., Barker, R. A., & Burn, D. J. (2013). The spectrum of nonmotor symptoms in early Parkinson disease. *Neurology*, *80*(3), 276-281.
- Kim, R., Healey K. L., Sepulveda-Orengo, M. T., Reissner, K. J. Astroglial correlates of neuropsychiatric disease: From astrocytopathy to astrogliosis (2018). *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. *20*;87(Pt A):126-146.

BIBLIOGRAFÍA

- Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1986). Pathogenesis of scrapie (strain 263K) in hamsters infected intracerebrally, intraperitoneally or intraocularly. *J Gen Virol*, *67* (Pt 2), 255-263.
- Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*, *45*(2-3), 191-202.
- Kirkwood, J. K., & Cunningham, A. A. (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec*, *135*(13), 296-303.
- Klatzo, I., Gajdusek, D. C., & Zigas, V. (1959). Pathology of Kuru. *Lab Invest*, *8*(4), 799-847.
- Kobayashi, A., Arima, K., Ogawa, M., Murata, M., Fukuda, T., & Kitamoto, T. (2008). Plaque-type deposition of prion protein in the damaged white matter of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease MM1 patients. *Acta Neuropathol*, *116*(5), 561-566.
- Kobayashi, A., Asano, M., Mohri, S., & Kitamoto, T. (2007). Cross-sequence transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease creates a new prion strain. *J Biol Chem*, *282*(41), 30022-30028.
- Kobayashi, A., Asano, M., Mohri, S., & Kitamoto, T. (2009). A traceback phenomenon can reveal the origin of prion infection. *Neuropathology*, *29*(5), 619-624.
- Kobayashi, A., Kitamoto, T., & Mizusawa, H. (2018). Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol*, *153*, 207-218
- Kobayashi, A., Matsuura, Y., Mohri, S., & Kitamoto, T. (2014). Distinct origins of dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease: past and future problems. *Acta Neuropathol Commun*, *2*, 32.
- Kobayashi, A., Teruya, K., Matsuura, Y., Shirai, T., Nakamura, Y., Yamada, M., Mizusawa, H., Mohri, S., & Kitamoto, T. (2015). The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update. *Acta Neuropathol*, *130*(2), 159-170.
- Kordower, J. H., Chu, Y., Hauser, R. A., Freeman, T. B., & Olanow, C. W. (2008). Lewy body-like pathology in long-term embryonic nigral transplants in Parkinson's disease. *Nat Med*, *14*(5), 504-506.
- Kovacs, G. G. (2017). Tauopathies. *Handb Clin Neurol*, *145*, 355-368. Kovacs, G. G., Preusser, M., Strohschneider, M., & Budka, H. (2005). Subcellular localization of disease-associated prion protein in the human brain. *Am J Pathol*, *166*(1), 287-294.
- Krejciova, Z., Alibhai, J., Zhao, C., Krencik, R., Rzechorzek, N. M., Ullian, E. M., Manson, J., Ironside, J. W., Head, M. W., & Chandran, S. (2017). Human stem cell-derived astrocytes replicate human prions in a PRNP genotype-dependent manner. *J Exp Med*, *214*(12), 3481-3495.

BIBLIOGRAFÍA

- Kretzschmar, H. A., Prusiner, S. B., Stowring, L. E., & DeArmond, S. J. (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*, *122*(1), 1-5.
- Kretzschmar, H. A., Sethi, S., Foldvari, Z., Windl, O., Querner, V., Zerr, I., & Poser, S. (2003). Latrogenic Creutzfeldt-Jakob disease with florid plaques. *Brain Pathol*, *13*(3), 245-249.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*, *19*(8), 312-318.
- Kriegstein, A., & Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*, *32*, 149-184.
- Kros, J. M., Schouten, W. C., Janssen, P. J., & van der Kwast, T. H. (1996). Proliferation of gemistocytic cells and glial fibrillary acidic protein (GFAP)-positive oligodendroglial cells in gliomas: a MIB-1/GFAP double labeling study. *Acta Neuropathol*, *91*(1), 99-103.
- Kuspert, M., & Wegner, M., (2016).Something 2 talk about-Transcriptional regulation in embryonic and adult oligodendrocyte precursors. *Brain Res* 1638, 167–182
- Ladogana, A., & Kovacs, G. G. (2018). Genetic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol*, *153*, 219-242.
- Ladogana, A., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Jarius, C., Collins, S., Klug, G. M., Sutcliffe, T., Giulivi, A., Alperovitch, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J. P., Poser, S., Kretzschmar, H., Rietveld, I., Mitrova, E., Cuesta Jde, P., Martinez-Martin, P., Glatzel, M., Aguzzi, A., Knight, R., Ward, H., Pocchiari, M., van Duijn, C. M., Will, R. G., & Zerr, I. (2005). Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, *64*(9), 1586-1591.
- Lafarga, M., Berciano, M. T., Saurez, I., Andres, M. A., & Berciano, J. (1993). Reactive astroglia-neuron relationships in the human cerebellar cortex: a quantitative, morphological and immunocytochemical study in Creutzfeldt-Jakob disease. *Int J Dev Neurosci*, *11*(2), 199-213.
- Lafarga, M., Berciano, M. T., Suarez, I., Viadero, C. F., Andres, M. A., & Berciano, J. (1991). Cytology and organization of reactive astroglia in human cerebellar cortex with severe loss of granule cells: a study on the ataxic form of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience*, *40*(2), 337-352.
- Langer, F., Eisele, Y. S., Fritschi, S. K., Staufenbiel, M., Walker, L. C., & Jucker, M. (2011). Soluble Abeta seeds are potent inducers of cerebral beta-amyloid deposition. *J Neurosci*, *31*(41), 14488-14495.

BIBLIOGRAFÍA

- Lannes, N., Eppler, E., Etemad, S., Yotovski, P., & Filgueira, L. (2017). Microglia at center stage: a comprehensive review about the versatile and unique residential macrophages of the central nervous system. *Oncotarget*, *8*(69), 114393-114413.
- Le, T. V., Crook, R., Hardy, J., & Dickson, D. W. (2001). Cotton wool plaques in non-familial late-onset Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *60*(11), 1051-1061.
- Lebouvier, T., Pasquier, F., Buée, L. (2017). Update on Tauopathies. *Curr Opin Neurol*. *30*(6):589-598.
- Li, J. Y., Englund, E., Holton, J. L., Soulet, D., Hagell, P., Lees, A. J., Lashley, T., Quinn, N. P., Rehncrona, S., Bjorklund, A., Widner, H., Revesz, T., Lindvall, O., & Brundin, P. (2008). Lewy bodies in grafted neurons in subjects with Parkinson's disease suggest host-to-graft disease propagation. *Nat Med*, *14*(5), 501-503.
- Liao, Y. C., Lebo, R. V., Clawson, G. A., & Smuckler, E. A. (1986). Human prion protein cDNA: molecular cloning, chromosomal mapping, and biological implications. *Science*, *233*(4761), 364-367.
- Liberski, P. P., & Brown, P. (2004). Astrocytes in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). *Folia Neuropathol*, *42 Suppl B*, 71-88.
- Liberski, P. P., Brown, P., Cervenakova, L., & Gajdusek, D. C. (1997). Interactions between astrocytes and oligodendroglia in human and experimental Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Exp Neurol*, *144*(1), 227-234.
- Liberski, P. P., Hainfellner, J. A., Sikorska, B., & Budka, H. (2012). Prion protein (PrP) deposits in the tectum of experimental Gerstmann-Straussler-Scheinker disease following intraocular inoculation. *Folia Neuropathol*, *50*(1), 85-88.
- Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Munch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., & Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481-487.
- Linden, R. (2017). The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. *Front Mol Neurosci*, *10*, 77.
- Liu, B., Teschemacher, A. G., & Kasparov, S. (2017). Astroglia as a cellular target for neuroprotection and treatment of neuro-psychiatric disorders. *Glia*, *65*(8), 1205-1226.
- Liu, L., Drouet, V., Wu, J. W., Witter, M. P., Small, S. A., Clelland, C., & Duff, K. (2012). Trans-synaptic spread of tau pathology in vivo. *PLoS One*, *7*(2), e31302.

BIBLIOGRAFÍA

- Liu, X., Zhang, Z., Guo, W., Burnstock, G., He, C., & Xiang, Z. (2013). The superficial glia limitans of mouse and monkey brain and spinal cord. *Anat Rec (Hoboken)*, 296(7), 995-1007.
- Lotan, M., & Schwartz, M. (1994). Cross talk between the immune system and the nervous system in response to injury: implications for regeneration. *FASEB J*, 8(13), 1026-1033.
- Luk, K. C., Kehm, V. M., Zhang, B., O'Brien, P., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2012). Intracerebral inoculation of pathological alpha-synuclein initiates a rapidly progressive neurodegenerative alpha-synucleinopathy in mice. *J Exp Med*, 209(5), 975-986.
- Lundgaard, I., Osorio, M. J., Kress, B. T., Sanggaard, S., & Nedergaard, M. (2014). White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*, 276, 161-173.
- Lyoo, C. H., Ikawa, M., Liow, J. S., Zoghbi, S. S., Morse, C. L., Pike, V. W., Fujita, M., Innis, R. B., & Kreisl, W. C. (2015). Cerebellum Can Serve As a Pseudo-Reference Region in Alzheimer Disease to Detect Neuroinflammation Measured with PET Radioligand Binding to Translocator Protein. *J Nucl Med*, 56(5), 701-706.
- Lyros, E., Bakogiannis, C., Liu, Y., & Fassbender, K. (2014). Molecular links between endothelial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 11(1), 18-26.
- Llorens, F., Lopez-Gonzalez, I., Thune, K., Carmona, M., Zafar, S., Andreoletti, O., Zerr, I., & Ferrer, I. (2014). Subtype and regional-specific neuroinflammation in sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Front Aging Neurosci*, 6, 198.
- Mabbott, N. A. (2017). How do PrP(Sc) Prions Spread between Host Species, and within Hosts? *Pathogens*, 6(4).
- MacDonald, S. T., Sutherland, K., Ironside, J. W. (1996). Prion protein protein genotype and pathological phenotype studies in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 1996 ;22(4):285-92.
- Mackenzie, I. R., Neumann, M., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G. G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I. E., Ince, P. G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A. J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., & Mann, D. M. (2009). Nomenclature for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: consensus recommendations. *Acta Neuropathol*, 117(1), 15-18.

BIBLIOGRAFÍA

- Mackenzie, I. R., Neumann, M., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Alafuzoff, I., Kril, J., Kovacs, G. G., Ghetti, B., Halliday, G., Holm, I. E., Ince, P. G., Kamphorst, W., Revesz, T., Rozemuller, A. J., Kumar-Singh, S., Akiyama, H., Baborie, A., Spina, S., Dickson, D. W., Trojanowski, J. Q., & Mann, D. M. (2010). Nomenclature and nosology for neuropathologic subtypes of frontotemporal lobar degeneration: an update. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 1-4.
- Manetto, V., Medori, R., Cortelli, P., Montagna, P., Tinuper, P., Baruzzi, A., Rancurel, G., Hauw, J. J., Vanderhaeghen, J. J., Maillieux, P., & et al. (1992). Fatal familial insomnia: clinical and pathologic study of five new cases. *Neurology*, *42*(2), 312-319.
- Manson, J. C., Clarke, A. R., McBride, P. A., McConnell, I., & Hope, J. (1994). PrP gene dosage determines the timing but not the final intensity or distribution of lesions in scrapie pathology. *Neurodegeneration*, *3*(4), 331-340.
- Manuelidis, L., Tesin, D. M., Sklaviadis, T., & Manuelidis, E. E. (1987). Astrocyte gene expression in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *84*(16), 5937-5941.
- Marella, M., & Chabry, J. (2004). Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci*, *24*(3), 620-627.
- Marin-Teva, J. L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., & Mallat, M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron*, *41*(4), 535-547.
- Marras, C., & Lang, A. (2013). Parkinson's disease subtypes: lost in translation? *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *84*(4), 409-415.
- Martinez-Martin, P., Rodriguez-Blazquez, C., Kurtis, M. M., Chaudhuri, K. R., & Group, N. V. (2011). The impact of non-motor symptoms on health-related quality of life of patients with Parkinson's disease. *Mov Disord*, *26*(3), 399-406.
- Mastrianni, J. A. (2010). The genetics of prion diseases. *Genet Med*, *12*(4), 187-195.
- Mastrianni, J. A., Nixon, R., Layzer, R., Telling, G. C., Han, D., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1999). Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N Engl J Med*, *340*(21), 1630-1638.
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Tago, H., McGeer, E.G.(1987) Reactive microglia in patients with senile dementia of the Alzheimer type are positive for the histocompatibility glycoprotein HLA-DR. *Neurosci Lett*. 1987 18;79(1-2):195-200
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., Bush, A. I., & Masters, C. L. (1999). Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, *46*(6), 860-866.

BIBLIOGRAFÍA

- Mead, S., Gandhi, S., Beck, J., Caine, D., Gallujipali, D., Carswell, C., Hyare, H., Joiner, S., Ayling, H., Lashley, T., Linehan, J. M., Al-Doujaily, H., Sharps, B., Revesz, T., Sandberg, M. K., Reilly, M. M., Koltzenburg, M., Forbes, A., Rudge, P., Brandner, S., Warren, J. D., Wadsworth, J. D. F., Wood, N. W., Holton, J. L., & Collinge, J. (2013). A novel prion disease associated with diarrhea and autonomic neuropathy. *N Engl J Med*, *369*(20), 1904-1914.
- Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A. L., Vigouret, J. M., Paganetti, P., Walsh, D. M., Mathews, P. M., Ghiso, J., Staufenbiel, M., Walker, L. C., & Jucker, M. (2006). Exogenous induction of cerebral beta-amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science*, *313*(5794), 1781-1784.
- Minikel, E. V., Vallabh, S. M., Lek, M., Estrada, K., Samocha, K. E., Sathirapongsasuti, J. F., McLean, C. Y., Tung, J. Y., Yu, L. P., Gambetti, P., Blevins, J., Zhang, S., Cohen, Y., Chen, W., Yamada, M., Hamaguchi, T., Sanjo, N., Mizusawa, H., Nakamura, Y., Kitamoto, T., Collins, S. J., Boyd, A., Will, R. G., Knight, R., Ponto, C., Zerr, I., Kraus, T. F., Eigenbrod, S., Giese, A., Calero, M., de Pedro-Cuesta, J., Haik, S., Laplanche, J. L., Bouaziz-Amar, E., Brandel, J. P., Capellari, S., Parchi, P., Pologgi, A., Ladogana, A., O'Donnell-Luria, A. H., Karczewski, K. J., Marshall, J. L., Boehnke, M., Laakso, M., Mohlke, K. L., Kahler, A., Chambert, K., McCarroll, S., Sullivan, P. F., Hultman, C. M., Purcell, S. M., Sklar, P., van der Lee, S. J., Rozemuller, A., Jansen, C., Hofman, A., Kraaij, R., van Rooij, J. G., Ikram, M. A., Uitterlinden, A. G., van Duijn, C. M., Exome Aggregation, C., Daly, M. J., & MacArthur, D. G. (2016). Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts. *Sci Transl Med*, *8*(322), 322ra329.
- Mirdamadi, J. L. (2016). Cerebellar role in Parkinson's disease. *J Neurophysiol*, *116*(3), 917-919.
- Miyazono, M., Iwaki, T., Kitamoto, T., Kaneko, Y., Doh-ura, K., & Tateishi, J. (1991). A comparative immunohistochemical study of Kuru and senile plaques with a special reference to glial reactions at various stages of amyloid plaque formation. *Am J Pathol*, *139*(3), 589-598.
- Moda, F., Gambetti, P., Notari, S., Concha-Marambio, L., Catania, M., Park, K. W., Maderna, E., Suardi, S., Haik, S., Brandel, J. P., Ironside, J., Knight, R., Tagliavini, F., & Soto, C. (2014). Prions in the urine of patients with variant Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*, *371*(6), 530-539.

BIBLIOGRAFÍA

- Mok, T., Jaunmuktane, Z., Joiner, S., Campbell, T., Morgan, C., Wakerley, B., Golestani, F., Rudge, P., Mead, S., Jager, H. R., Wadsworth, J. D., Brandner, S., & Collinge, J. (2017). Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129. *N Engl J Med*, *376*(3), 292-294.
- Montine, T. J., Phelps, C. H., Beach, T. G., Bigio, E. H., Cairns, N. J., Dickson, D. W., Duyckaerts, C., Frosch, M. P., Masliah, E., Mirra, S. S., Nelson, P. T., Schneider, J. A., Thal, D. R., Trojanowski, J. Q., Vinters, H. V., Hyman, B. T., National Institute on, A., & Alzheimer's, A. (2012). National Institute on Aging-Alzheimer's Association guidelines for the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease: a practical approach. *Acta Neuropathol*, *123*(1), 1-11.
- Monzon, M., Hernandez, R. S., Garces, M., Sarasa, R., & Badiola, J. J. (2018). Glial alterations in human prion diseases: A correlative study of astroglia, reactive microglia, protein deposition, and neuropathological lesions. *Medicine (Baltimore)*, *97*(15), e0320.
- Moore, R. A., Taubner, L. M., & Priola, S. A. (2009). Prion protein misfolding and disease. *Curr Opin Struct Biol*, *19*(1), 14-22.
- Morgan, D. (2009). The role of microglia in antibody-mediated clearance of amyloid-beta from the brain. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *8*(1), 7-15.
- Moser, M., Colello, R. J., Pott, U., & Oesch, B. (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*, *14*(3), 509-517.
- Muhleisen, H., Gehrman, J., & Meyermann, R. (1995). Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *21*(6), 505-517.
- Mullin, S., & Schapira, A. (2015). The genetics of Parkinson's disease. *Br Med Bull*, *114*(1), 39-52.
- Murray, M. E., DeJesus-Hernandez, M., Rutherford, N. J., Baker, M., Duara, R., Graff-Radford, N. R., Wszolek, Z. K., Ferman, T. J., Josephs, K. A., Boylan, K. B., Rademakers, R., & Dickson, D. W. (2011). Clinical and neuropathologic heterogeneity of c9FTD/ALS associated with hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72. *Acta Neuropathol*, *122*(6), 673-690.
- Murray, M. E., Graff-Radford, N. R., Ross, O. A., Petersen, R. C., Duara, R., & Dickson, D. W. (2011). Neuropathologically defined subtypes of Alzheimer's disease with distinct clinical characteristics: a retrospective study. *Lancet Neurol*, *10*(9), 785-796.

BIBLIOGRAFÍA

- Narasimhan, S., Guo, J. L., Changolkar, L., Stieber, A., McBride, J. D., Silva, L. V., He, Z., Zhang, B., Gathagan, R. J., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. Y. (2017). Pathological Tau Strains from Human Brains Recapitulate the Diversity of Tauopathies in Nontransgenic Mouse Brain. *J Neurosci*, *37*(47), 11406-11423.
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314-1318.
- Nishiyama, A., Komitova, M., Suzuki, R. & Zhu, X. Polydendrocytes (NG2 cells): multifunctional cells with lineage plasticity. *NatRev Neurosci* *10*, 9–22 (2009).
- Noguchi-Shinohara, M., Hamaguchi, T., Kitamoto, T., Sato, T., Nakamura, Y., Mizusawa, H., & Yamada, M. (2007). Clinical features and diagnosis of dura mater graft associated Creutzfeldt Jakob disease. *Neurology*, *69*(4), 360-367.
- Notari, S., Appleby, B. S., & Gambetti, P. (2018). Variably protease-sensitive prionopathy. *Handb Clin Neurol*, *153*, 175-190.
- Notari, S., Capellari, S., Giese, A., Westner, I., Baruzzi, A., Ghetti, B., Gambetti, P., Kretschmar, H. A., & Parchi, P. (2004). Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem*, *279*(16), 16797-16804.
- Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, *29*(10), 3276-3287.
- Oberheim, N. A., Wang, X., Goldman, S., & Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci*, *29*(10), 547-553.
- Obst, J., Simon, E., Mancuso, R., & Gomez-Nicola, D. (2017). The Role of Microglia in Prion Diseases: A Paradigm of Functional Diversity. *Front Aging Neurosci*, *9*, 207.
- Ogata, K., & Kosaka, T. (2002). Structural and quantitative analysis of astrocytes in the mouse hippocampus. *Neuroscience*, *113*(1), 221-233.
- Olabarria, M., Noristani, H. N., Verkhratsky, A., & Rodriguez, J. J. (2011). Age-dependent decrease in glutamine synthetase expression in the hippocampal astroglia of the triple transgenic Alzheimer's disease mouse model: mechanism for deficient glutamatergic transmission? *Mol Neurodegener*, *6*, 55.
- Olney, N. T., Spina, S., & Miller, B. L. (2017). Frontotemporal Dementia. *Neurol Clin*, *35*(2), 339-374.
- Orihuela, R., McPherson, C. A., & Harry, G. J. (2016). Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *Br J Pharmacol*, *173*(4), 649-665.

BIBLIOGRAFÍA

- Ortega-Cubero, S., Luquin, M. R., Dominguez, I., Arbizu, J., Pagola, I., Carmona-Abellan, M. M., & Riverol, M. (2013). Structural and functional neuroimaging in human prion diseases. *Neurología*, 28(5), 299-308.
- Otto, A., Zerr, I., Lantsch, M., Weidehaas, K., Riedemann, C., & Poser, S. (1998). Akinetic mutism as a classification criterion for the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 64(4), 524-528.
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 352(6333), 340-342.
- Parchi, P., Capellari, S., Chen, S. G., Petersen, R. B., Gambetti, P., Kopp, N., Brown, P., Kitamoto, T., Tateishi, J., Giese, A., & Kretzschmar, H. (1997). Typing prion isoforms. *Nature*, 386(6622), 232-234.
- Parchi, P., Capellari, S., Chin, S., Schwarz, H. B., Schechter, N. P., Butts, J. D., Hudkins, P., Burns, D. K., Powers, J. M., & Gambetti, P. (1999). A subtype of sporadic prion disease mimicking fatal familial insomnia. *Neurology*, 52(9), 1757-1763.
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B., & Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, 39(6), 767-778.
- Parchi, P., de Boni, L., Saverioni, D., Cohen, M. L., Ferrer, I., Gambetti, P., Gelpi, E., Giaccone, G., Hauw, J. J., Hoftberger, R., Ironside, J. W., Jansen, C., Kovacs, G. G., Rozemuller, A., Seilhean, D., Tagliavini, F., Giese, A., & Kretzschmar, H. A. (2012). Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta Neuropathol*, 124(4), 517-529.
- Parchi, P., Giese, A., Capellari, S., Brown, P., Schulz-Schaeffer, W., Windl, O., Zerr, I., Budka, H., Kopp, N., Piccardo, P., Poser, S., Rojiani, A., Streichemberger, N., Julien, J., Vital, C., Ghetti, B., Gambetti, P., & Kretzschmar, H. (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol*, 46(2), 224-233.
- Parchi, P., & Saverioni, D. (2012). Molecular pathology, classification, and diagnosis of sporadic human prion disease variants. *Folia Neuropathol*, 50(1), 20-45.

BIBLIOGRAFÍA

- Parchi, P., Strammiello, R., Notari, S., Giese, A., Langeveld, J. P., Ladogana, A., Zerr, I., Roncaroli, F., Cras, P., Ghetti, B., Pocchiari, M., Kretzschmar, H., & Capellari, S. (2009). Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta Neuropathol*, *118*(5), 659-671.
- Pasqualetti, G., Brooks, D. J., & Edison, P. (2015). The role of neuroinflammation in dementias. *Curr Neurol Neurosci Rep*, *15*(4), 17.
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E., & Ironside, J. W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, *364*(9433), 527-529.
- Pekny, M., Pekna, M., Messing, A., Steinhauser, C., Lee, J. M., Parpura, V., Hol, E. M., Sofroniew, M. V., & Verkhratsky, A. (2016). Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*, *131*(3), 323-345.
- Perea, G., Navarrete, M., & Araque, A. (2009). Tripartite synapses: astrocytes process and control synaptic information. *Trends Neurosci*, *32*(8), 421-431.
- Perry, R. T., Go, R. C., Harrell, L. E., & Acton, R. T. (1995). SSCP analysis and sequencing of the human prion protein gene (PRNP) detects two different 24 bp deletions in an atypical Alzheimer's disease family. *Am J Med Genet*, *60*(1), 12-18.
- Peyrin, J. M., Lasmezas, C. I., Haik, S., Tagliavini, F., Salmona, M., Williams, A., Richie, D., Deslys, J. P., & Dormont, D. (1999). Microglial cells respond to amyloidogenic PrP peptide by the production of inflammatory cytokines. *Neuroreport*, *10*(4), 723-729.
- Piccini, A., Russo, C., Gliozzi, A., Relini, A., Vitali, A., Borghi, R., Giliberto, L., Armirotti, A., D'Arrigo, C., Bachi, A., Cattaneo, A., Canale, C., Torrassa, S., Saido, T. C., Markesbery, W., Gambetti, P., & Tabaton, M. (2005). beta-amyloid is different in normal aging and in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, *280*(40), 34186-34192.
- Pocchiari, M., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Gelpi, E., Collins, S., Lewis, V., Sutcliffe, T., Guilivi, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J. P., Alperovitch, A., Zerr, I., Poser, S., Kretzschmar, H. A., Ladogana, A., Rietvald, I., Mitrova, E., Martinez-Martin, P., de Pedro-Cuesta, J., Glatzel, M., Aguzzi, A., Cooper, S., Mackenzie, J., van Duijn, C. M., & Will, R. G. (2004). Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain*, *127*(Pt 10), 2348-2359.

BIBLIOGRAFÍA

- Porta, S., Xu, Y., Restrepo, C. R., Kwong, L. K., Zhang, B., Brown, H. J., Lee, E. B., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2018). Patient-derived frontotemporal lobar degeneration brain extracts induce formation and spreading of TDP-43 pathology in vivo. *Nat Commun*, 9(1), 4220.
- Porter, D. D., Porter, H. G., & Cox, N. A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, 111(5), 1407-1410.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B. (2012). Cell biology. A unifying role for prions in neurodegenerative diseases. *Science*, 336(6088), 1511-1513.
- Prusiner, S. B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet*, 47, 601-623.
- Prusiner, S. B., Groth, D., Serban, A., Koehler, R., Foster, D., Torchia, M., Burton, D., Yang, S. L., & DeArmond, S. J. (1993). Ablation of the prion protein (PrP) gene in mice prevents scrapie and facilitates production of anti-PrP antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(22), 10608-10612.
- Prusiner, S. B., Woerman, A. L., Mordes, D. A., Watts, J. C., Rampersaud, R., Berry, D. B., Patel, S., Oehler, A., Lowe, J. K., Kravitz, S. N., Geschwind, D. H., Glidden, D. V., Halliday, G. M., Middleton, L. T., Gentleman, S. M., Grinberg, L. T., & Giles, K. (2015). Evidence for alpha-synuclein prions causing multiple system atrophy in humans with parkinsonism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(38), E5308-5317.
- Puckett, C., Concannon, P., Casey, C., & Hood, L. (1991). Genomic structure of the human prion protein gene. *Am J Hum Genet*, 49(2), 320-329.
- Puoti, G., Bizzi, A., Forloni, G., Safar, J. G., Tagliavini, F., & Gambetti, P. (2012). Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis. *Lancet Neurol*, 11(7), 618-628.
- Puoti, G., Giaccone, G., Mangieri, M., Limido, L., Fociani, P., Zerbi, P., Suardi, S., Rossi, G., Iussich, S., Capobianco, R., Di Fede, G., Marcon, G., Cotrufo, R., Filippini, G., Bugiani, O., & Tagliavini, F. (2005). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: the extent of microglia activation is dependent on the biochemical type of PrPSc. *J Neuropathol Exp Neurol*, 64(10), 902-909.
- Qiang, W., Yau, W. M., Lu, J. X., Collinge, J., & Tycko, R. (2017). Structural variation in amyloid-beta fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature*, 541(7636), 217-221.

BIBLIOGRAFÍA

- Race, R. E., Priola, S. A., Bessen, R. A., Ernst, D., Dockter, J., Rall, G. F., Mucke, L., Chesebro, B., & Oldstone, M. B. (1995). Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron*, *15*(5), 1183-1191.
- Radford, R. A., Morsch, M., Rayner, S. L., Cole, N. J., Pountney, D. L., & Chung, R. S. (2015). The established and emerging roles of astrocytes and microglia in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. *Front Cell Neurosci*, *9*, 414.
- Raeber, A. J., Race, R. E., Brandner, S., Priola, S. A., Sailer, A., Bessen, R. A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M. B., Weissmann, C., & Chesebro, B. (1997). Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J*, *16*(20), 6057-6065.
- Rangel, A., Race, B., Phillips, K., Striebel, J., Kurtz, N., & Chesebro, B. (2014). Distinct patterns of spread of prion infection in brains of mice expressing anchorless or anchored forms of prion protein. *Acta Neuropathol Commun*, *2*, 8.
- Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, *353*(6301), 777-783.
- Rasmussen, J., Mahler, J., Beschorner, N., Kaeser, S. A., Hasler, L. M., Baumann, F., Nystrom, S., Portelius, E., Blennow, K., Lashley, T., Fox, N. C., Sepulveda-Falla, D., Glatzel, M., Oblak, A. L., Ghetti, B., Nilsson, K. P. R., Hammarstrom, P., Staufienbiel, M., Walker, L. C., & Jucker, M. (2017). Amyloid polymorphisms constitute distinct clouds of conformational variants in different etiological subtypes of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *114*(49), 13018-13023.
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2017). Comparative anatomy of glial cells in mammals. In: *Evolution of Nervous Systems* (2nd ed.), edited by Kaas J. New York: Academic Press/Elsevier, . 309–348.
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and biomarkers. *Biochem Pharmacol*, *88*(4), 640-651.
- Rey, N. L., Steiner, J. A., Maroof, N., Luk, K. C., Madaj, Z., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., & Brundin, P. (2016). Widespread transneuronal propagation of alpha-synucleinopathy triggered in olfactory bulb mimics prodromal Parkinson's disease. *J Exp Med*, *213*(9), 1759-1778.

BIBLIOGRAFÍA

- Ritchie, D. L., Adlard, P., Peden, A. H., Lowrie, S., Le Grice, M., Burns, K., Jackson, R. J., Yull, H., Keogh, M. J., Wei, W., Chinnery, P. F., Head, M. W., & Ironside, J. W. (2017). Amyloid-beta accumulation in the CNS in human growth hormone recipients in the UK. *Acta Neuropathol*, *134*(2), 221-240.
- Ritchie, D. L., Barria, M. A., Peden, A. H., Yull, H. M., Kirkpatrick, J., Adlard, P., Ironside, J. W., & Head, M. W. (2017). UK Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: investigating human prion transmission across genotypic barriers using human tissue-based and molecular approaches. *Acta Neuropathol*, *133*(4), 579-595.
- Ritchie, D. L., Boyle, A., McConnell, I., Head, M. W., Ironside, J. W., & Bruce, M. E. (2009). Transmissions of variant Creutzfeldt-Jakob disease from brain and lymphoreticular tissue show uniform and conserved bovine spongiform encephalopathy-related phenotypic properties on primary and secondary passage in wild-type mice. *J Gen Virol*, *90*(Pt 12), 3075-3082.
- Rogers, J., Lubner-Narod, J., Styren, S. D., and Civin, W. H. (1988). Expression of immune system-associated antigens by cells of the human central nervous system: relationship to the pathology of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *9*, 339-349.
- Rogers, J., Cooper, N. R., Webster, S., Schultz, J., McGeer, P. L., Styren, S. D., Civin, W. H., Brachova, L., Bradt, B., Ward, P., & et al. (1992). Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *89*(21), 10016-10020.
- Rosen, D. R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D. A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J. P., Deng, H. X., & et al. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, *362*(6415), 59-62.
- Ross, C. A., & Tabrizi, S. J. (2011). Huntington's disease: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Lancet Neurol*, *10*(1), 83-98.
- Ross, M. H., & Pawlina, W. (2015). *Histología: Texto y atlas color con biología celular y molecular / Michael H. Ross y Wojciech Pawlina (7a. ed.)* Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Rossi, M., Saverioni, D., Di Bari, M., Baiardi, S., Lemstra, A. W., Pirisinu, L., Capellari, S., Rozemuller, A., Nonno, R., & Parchi, P. (2017). Atypical Creutzfeldt-Jakob disease with PrP-amyloid plaques in white matter: molecular characterization and transmission to bank voles show the M1 strain signature. *Acta Neuropathol Commun*, *5*(1), 87.
- Roy, S., Zhang, B., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (2005). Axonal transport defects: a common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol*, *109*(1), 5-13.

BIBLIOGRAFÍA

- Rub, U., Seidel, K., Heinsen, H., Vonsattel, J. P., den Dunnen, W. F., & Korf, H. W. (2016). Huntington's disease (HD): the neuropathology of a multisystem neurodegenerative disorder of the human brain. *Brain Pathol*, *26*(6), 726-740.
- Rubinsztein, D. C., Leggo, J., Coles, R., Almqvist, E., Biancalana, V., Cassiman, J. J., Chotai, K., Connarty, M., Crauford, D., Curtis, A., Curtis, D., Davidson, M. J., Differ, A. M., Dode, C., Dodge, A., Frontali, M., Ranen, N. G., Stine, O. C., Sherr, M., Abbott, M. H., Franz, M. L., Graham, C. A., Harper, P. S., Hedreen, J. C., Hayden, M. R., & et al. (1996). Phenotypic characterization of individuals with 30-40 CAG repeats in the Huntington disease (HD) gene reveals HD cases with 36 repeats and apparently normal elderly individuals with 36-39 repeats. *Am J Hum Genet*, *59*(1), 16-22.
- Rudge, P., Jaunmuktane, Z., Adlard, P., Bjurstrom, N., Caine, D., Lowe, J., Norsworthy, P., Hummerich, H., Druyeh, R., Wadsworth, J. D., Brandner, S., Hyare, H., Mead, S., & Collinge, J. (2015). Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years. *Brain*, *138*(Pt 11), 3386-3399.
- Sabeti, S., Stauffer, J. E., Schulte, D. J., & Ravits, J. (2015). Neuropathology of Amyotrophic Lateral Sclerosis and Its Variants. *Neurol Clin*, *33*(4), 855-876.
- Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, *411*(6839), 810-813.
- Safar, J. G., Geschwind, M. D., Deering, C., Didorenko, S., Sattavat, M., Sanchez, H., Serban, A., Vey, M., Baron, H., Giles, K., Miller, B. L., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Diagnosis of human prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(9), 3501-3506.
- Sagare, A. P., Bell, R. D., & Zlokovic, B. V. (2012). Neurovascular dysfunction and faulty amyloid beta-peptide clearance in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *2*(10).
- Saijo, K., & Glass, C. K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol*, *11*(11), 775-787.
- Salter, M. W., & Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med*, *23*(9), 1018-1027.
- Sanchez-Juan, P., Cousens, S. N., Will, R. G., & van Duijn, C. M. (2007). Source of variant Creutzfeldt-Jakob disease outside United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, *13*(8), 1166-1169.
- Sarasa, R., Junquera, C., Toledano, A., Badiola, J. J., & Monzon, M. (2015). Ultrastructural changes in the progress of natural Scrapie regardless fixation protocol. *Histochem Cell Biol*, *144*(1), 77-85.

BIBLIOGRAFÍA

- Sarasa, R., Martinez, A., Monleon, E., Bolea, R., Vargas, A., Badiola, J. J., & Monzon, M. (2012). Involvement of astrocytes in transmissible spongiform encephalopathies: a confocal microscopy study. *Cell Tissue Res*, *350*(1), 127-134.
- Sargent, D., Verchere, J., Lazizzera, C., Gaillard, D., Lakhdar, L., Streichenberger, N., Morignat, E., Betemps, D., & Baron, T. (2017). 'Prion-like' propagation of the synucleinopathy of M83 transgenic mice depends on the mouse genotype and type of inoculum. *J Neurochem*, *143*(1), 126-135.
- Sarna, J. R., & Hawkes, R. (2003). Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol*, *70*(6), 473-507.
- Sasaki, A., Hirato, J., & Nakazato, Y. (1993). Immunohistochemical study of microglia in the Creutzfeldt-Jakob diseased brain. *Acta Neuropathol*, *86*(4), 337-344.
- Satoh, K., Muramoto, T., Tanaka, T., Kitamoto, N., Ironside, J. W., Nagashima, K., Yamada, M., Sato, T., Mohri, S., & Kitamoto, T. (2003). Association of an 11-12 kDa protease-resistant prion protein fragment with subtypes of dura graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease and other prion diseases. *J Gen Virol*, *84*(Pt 10), 2885-2893.
- Scrimgeour, E. M., Masters, C. L., Alpers, M. P., Kaven, J., & Gajusek, D. C. (1983). A clinicopathological study of a case of kuru. *J Neurol Sci*, *59*(2), 265-275.
- Schmitz, M., Dittmar, K., Llorens, F., Gelpi, E., Ferrer, I., Schulz-Schaeffer, W. J., & Zerr, I. (2017). Hereditary Human Prion Diseases: an Update. *Mol Neurobiol*, *54*(6), 4138-4149.
- Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., & Raab, W. H. (2008). The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull*, *77*(6), 343-355.
- Sebeo, J., Hof, P. R., & Perl, D. P. (2004). Occurrence of alpha-synuclein pathology in the cerebellum of Guamanian patients with parkinsonism-dementia complex. *Acta Neuropathol*, *107*(6), 497-503.
- Semaka, A., Kay, C., Doty, C., Collins, J. A., Bijlsma, E. K., Richards, F., Goldberg, Y. P., & Hayden, M. R. (2013). CAG size-specific risk estimates for intermediate allele repeat instability in Huntington disease. *J Med Genet*, *50*(10), 696-703.
- Serrano-Pozo, A., Frosch, M. P., Masliah, E., & Hyman, B. T. (2011). Neuropathological alterations in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *1*(1), a006189.
- Sherzai, A., Edland, S. D., Masliah, E., Hansen, L., Pizzo, D. P., Sherzai, A., & Corey-Bloom, J. (2013). Spongiform change in dementia with Lewy bodies and Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *27*(2), 157-161.

BIBLIOGRAFÍA

- Shimizu, S., Hoshi, K., Muramoto, T., Homma, M., Ironside, J. W., Kuzuhara, S., Sato, T., Yamamoto, T., & Kitamoto, T. (1999). Creutzfeldt-Jakob disease with florid-type plaques after cadaveric dura mater grafting. *Arch Neurol*, *56*(3), 357-362.
- Sierra, A., Encinas, J. M., Deudero, J. J., Chancey, J. H., Enikolopov, G., Overstreet-Wadiche, L. S., Tsirka, S. E., & Maletic-Savatic, M. (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, *7*(4), 483-495.
- Sikorska, B., Knight, R., Ironside, J. W., & Liberski, P. P. (2012). Creutzfeldt-Jakob disease. *Adv Exp Med Biol*, *724*, 76-90.
- Sikorska, B., Liberski, P. P., Sobow, T., Budka, H., & Ironside, J. W. (2009). Ultrastructural study of florid plaques in variant Creutzfeldt-Jakob disease: a comparison with amyloid plaques in kuru, sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *35*(1), 46-59.
- Silver, J., & Miller, J. H. (2004). Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, *5*(2), 146-156.
- Sjoberck, M., & Englund, E. (2001). Alzheimer's disease and the cerebellum: a morphologic study on neuronal and glial changes. *Dement Geriatr Cogn Disord*, *12*(3), 211-218.
- Smith, T. W., Anwer, U., DeGirolami, U., & Drachman, D. A. (1987). Vacuolar change in Alzheimer's disease. *Arch Neurol*, *44*(12), 1225-1228.
- Snell, R. G., MacMillan, J. C., Cheadle, J. P., Fenton, I., Lazarou, L. P., Davies, P., MacDonald, M. E., Gusella, J. F., Harper, P. S., & Shaw, D. J. (1993). Relationship between trinucleotide repeat expansion and phenotypic variation in Huntington's disease. *Nat Genet*, *4*(4), 393-397.
- Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, *32*(12), 638-647.
- Sofroniew, M. V. (2014a). Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(2), a020420.
- Sofroniew, M. V. (2014b). Multiple roles for astrocytes as effectors of cytokines and inflammatory mediators. *Neuroscientist*, *20*(2), 160-172.
- Sofroniew, M. V., & Vinters, H. V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*, *119*(1), 7-35.
- Sreedharan, J., Blair, I. P., Tripathi, V. B., Hu, X., Vance, C., Rogelj, B., Ackerley, S., Durnall, J. C., Williams, K. L., Buratti, E., Baralle, F., de Bellerocche, J., Mitchell, J. D., Leigh, P. N., Al-Chalabi, A., Miller, C. C., Nicholson, G., & Shaw, C. E. (2008). TDP-43 mutations in familial and sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *Science*, *319*(5870), 1668-1672.

BIBLIOGRAFÍA

- Streit, W. J., & Kincaid-Colton, C. A. (1995). The brain's immune system. *Sci Am*, 273(5), 54-55, 58-61.
- Streit, W. J., Mrak, R. E., & Griffin, W. S. (2004). Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *J Neuroinflammation*, 1(1), 14.
- Streit, W. J. (2010). Microglial activation and neuroinflammation in Alzheimer's disease: a critical examination of recent history. *Front Aging Neurosci*. 3;2:22.
- Streit, W. J., Xue, Q. S., Tischer, J., & Bechmann, I. (2014). Microglial pathology. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 142.
- Sturrock, R. R. (1989). Age related changes in neuron number in the mouse lateral vestibular nucleus. *J Anat*, 166, 227-232.
- Szpak, G. M., Lewandowska, E., Lechowicz, W., Wierzb-Bobrowicz, T., Kulczycki, J., Bertrand, E., Pasennik, E., & Dymecki, J. (2006). The brain immune response in human prion diseases. Microglial activation and microglial disease. I. Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol*, 44(3), 202-213.
- Takada, L. T., Kim, M. O., Metcalf, S., Gala, II, & Geschwind, M. D. (2018). Prion disease. *Handb Clin Neurol*, 148, 441-464.
- Taraboulos, A., Jendroska, K., Serban, D., Yang, S. L., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1992). Regional mapping of prion proteins in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16), 7620-7624.
- Thal, D. R., Beach, T. G., Zhanette, M., Heurling, K., Chakrabarty, A., Ismail, A., Smith, A. P., & Buckley, C. (2015). [(18)F]flutemetamol amyloid positron emission tomography in preclinical and symptomatic Alzheimer's disease: specific detection of advanced phases of amyloid-beta pathology. *Alzheimers Dement*, 11(8), 975-985.
- Thal, D. R., Ghebremedhin, E., Rub, U., Yamaguchi, H., Del Tredici, K., & Braak, H. (2002). Two types of sporadic cerebral amyloid angiopathy. *J Neuropathol Exp Neurol*, 61(3), 282-293.
- Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.
- THE NATIONAL CJD RESEARCH & SURVEILLANCE UNIT (NCJDRSU), U. O. E. D. C. (2019). THE NATIONAL CJD RESEARCH & SURVEILLANCE UNIT (NCJDRSU). Diagnostic Criteria. disponible en: <https://www.cjd.ed.ac.uk/sites/default/files/criteria.pdf> [30 Enero 2019].
- Thenganatt, M. A., & Jankovic, J. (2014). Parkinson disease subtypes. *JAMA Neurol*, 71(4), 499-504.

BIBLIOGRAFÍA

- Thompson, K. K., & Tsirka, S. E. (2017). The Diverse Roles of Microglia in the Neurodegenerative Aspects of Central Nervous System (CNS) Autoimmunity. *Int J Mol Sci*, *18*(3).
- Tremblay, M. E., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., & Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J Neurosci*, *31*(45), 16064-16069.
- Trojanowski, J. Q., & Mattson, M. P. (2003). Overview of protein aggregation in single, double, and triple neurodegenerative brain amyloidoses. *Neuromolecular Med*, *4*(1-2), 1-6.
- Umekawa, T., Osman, A. M., Han, W., Ikeda, T., & Blomgren, K. (2015). Resident microglia, rather than blood-derived macrophages, contribute to the earlier and more pronounced inflammatory reaction in the immature compared with the adult hippocampus after hypoxia-ischemia. *Glia*, *63*(12), 2220-2230.
- v Eitzen, U., Egensperger, R., Kosel, S., Grasbon-Frodl, E. M., Imai, Y., Bise, K., Kohsaka, S., Mehraein, P., & Graeber, M. B. (1998). Microglia and the development of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, *57*(3), 246-256.
- Van Everbroeck, B., Dewulf, E., Pals, P., Lubke, U., Martin, J. J., & Cras, P. (2002). The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging*, *23*(1), 59-64.
- Vance, C., Rogelj, B., Hortobagyi, T., De Vos, K. J., Nishimura, A. L., Sreedharan, J., Hu, X., Smith, B., Ruddy, D., Wright, P., Ganesalingam, J., Williams, K. L., Tripathi, V., Al-Saraj, S., Al-Chalabi, A., Leigh, P. N., Blair, I. P., Nicholson, G., de Belleruche, J., Gallo, J. M., Miller, C. C., & Shaw, C. E. (2009). Mutations in FUS, an RNA processing protein, cause familial amyotrophic lateral sclerosis type 6. *Science*, *323*(5918), 1208-1211.
- Verkhatsky, A., & Nedergaard, M. (2018). Physiology of Astroglia. *Physiol Rev*, *98*(1), 239-389.
- Verkhatsky, A., & Parpura, V. (2016). Astroglipathology in neurological, neurodevelopmental and psychiatric disorders. *Neurobiol Dis*, *85*, 254-261.
- Victoria, G. S., Arkhipenko, A., Zhu, S., Syan, S., & Zurzolo, C. (2016). Astrocyte-to-neuron intercellular prion transfer is mediated by cell-cell contact. *Sci Rep*, *6*, 20762.
- Vincenti, J. E., Murphy, L., Grabert, K., McColl, B. W., Cancellotti, E., Freeman, T. C., & Manson, J. C. (2015). Defining the Microglia Response during the Time Course of Chronic Neurodegeneration. *J Virol*, *90*(6), 3003-3017.
- von Bartheld, C. S., Bahney, J., & Herculano-Houzel, S. (2016). The search for true numbers of neurons and glial cells in the human brain: A review of 150 years of cell counting. *J Comp Neurol*, *524*(18), 3865-3895.

BIBLIOGRAFÍA

- Vonsattel, J. P., Myers, R. H., Stevens, T. J., Ferrante, R. J., Bird, E. D., & Richardson, E. P., Jr. (1985). Neuropathological classification of Huntington's disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 44(6), 559-577.
- Wadsworth, J. D., Hill, A. F., Joiner, S., Jackson, G. S., Clarke, A. R., & Collinge, J. (1999). Strain-specific prion-protein conformation determined by metal ions. *Nat Cell Biol*, 1(1), 55-59.
- Waldvogel, H. J., Kim, E. H., Tippett L. J., Vonsattel J. P., Faull R. L., (2014). The neuropathology of huntington's disease. *Curr Top Behav Neurosci*. 2015;22:33-80.
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem*, 101(5), 1172-1184.
- Ward, H. J., Everington, D., Cousens, S. N., Smith-Bathgate, B., Leitch, M., Cooper, S., Heath, C., Knight, R. S., Smith, P. G., & Will, R. G. (2006). Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Ann Neurol*, 59(1), 111-120.
- Watts, J. C., Condello, C., Stohr, J., Oehler, A., Lee, J., DeArmond, S. J., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Giles, K., & Prusiner, S. B. (2014). Serial propagation of distinct strains of Abeta prions from Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(28), 10323-10328.
- Webster, M. J., Knable, M. B., Johnston-Wilson, N., Nagata, K., Inagaki, M., Yolken, R. H. (2001). Immunohistochemical localization of phosphorylated glial fibrillary acidic protein in the prefrontal cortex and hippocampus from patients with schizophrenia, bipolar disorder, and depression. *Brain Behav Immun*. 15(4):388-400.
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., & Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, 121(18), 419-420.

BIBLIOGRAFÍA

- Wexler, N. S., Lorimer, J., Porter, J., Gomez, F., Moskowitz, C., Shackell, E., Marder, K., Penchaszadeh, G., Roberts, S. A., Gayan, J., Brocklebank, D., Cherny, S. S., Cardon, L. R., Gray, J., Dlouhy, S. R., Wiktorski, S., Hodes, M. E., Conneally, P. M., Penney, J. B., Gusella, J., Cha, J. H., Irizarry, M., Rosas, D., Hersch, S., Hollingsworth, Z., MacDonald, M., Young, A. B., Andresen, J. M., Housman, D. E., De Young, M. M., Bonilla, E., Stillings, T., Negrette, A., Snodgrass, S. R., Martinez-Jaurrieta, M. D., Ramos-Arroyo, M. A., Bickham, J., Ramos, J. S., Marshall, F., Shoulson, I., Rey, G. J., Feigin, A., Arnheim, N., Acevedo-Cruz, A., Acosta, L., Alvir, J., Fischbeck, K., Thompson, L. M., Young, A., Dure, L., O'Brien, C. J., Paulsen, J., Brickman, A., Krch, D., Peery, S., Hogarth, P., Higgins, D. S., Jr., Landwehrmeyer, B., & Project, U. S.-V. C. R. (2004). Venezuelan kindreds reveal that genetic and environmental factors modulate Huntington's disease age of onset. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(10), 3498-3503.
- Wieser, H. G., Schwarz, U., Blattler, T., Bernoulli, C., Sitzler, M., Stoeck, K., & Glatzel, M. (2004). Serial EEG findings in sporadic and iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neurophysiol*, *115*(11), 2467-2478.
- Wilham, J. M., Orru, C. D., Bessen, R. A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., Meade-White, K. D., Taubner, L. M., Timmes, A., & Caughey, B. (2010). Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS Pathog*, *6*(12), e1001217.
- Will, R. G. (2003). Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru. *Br Med Bull*, *66*, 255-265.
- Will, R. G., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., Mitrova, E., de Silva, R., D'Alessandro, M., Delasnerie-Laupretre, N., Zerr, I., & van Duijn, C. (1998). Descriptive epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease in six European countries, 1993-1995. EU Collaborative Study Group for CJD. *Ann Neurol*, *43*(6), 763-767.
- Will, R. G., & Ironside, J. W. (2017). Sporadic and Infectious Human Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *7*(1).
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, *347*(9006), 921-925.
- Williams, A., Lucassen, P. J., Ritchie, D., & Bruce, M. (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol*, *144*(2), 433-438.

BIBLIOGRAFÍA

- Williams, A., Van Dam, A. M., Ritchie, D., Eikelenboom, P., & Fraser, H. (1997). Immunocytochemical appearance of cytokines, prostaglandin E2 and lipocortin-1 in the CNS during the incubation period of murine scrapie correlates with progressive PrP accumulations. *Brain Res*, 754(1-2), 171-180.
- Williams, A. E., Lawson, L. J., Perry, V. H., & Fraser, H. (1994). Characterization of the microglial response in murine scrapie. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 20(1), 47-55.
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, 16(1), 89-98.
- Woerman, A. L., Kazmi, S. A., Patel, S., Aoyagi, A., Oehler, A., Widjaja, K., Mordes, D. A., Olson, S. H., & Prusiner, S. B. (2018). Familial Parkinson's point mutation abolishes multiple system atrophy prion replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(2), 409-414.
- Wojtera, M., Sobow, T., Kloszewska, I., Liberski, P. P., Brown, D. R., & Sikorska, B. (2012). Expression of immunohistochemical markers on microglia in Creutzfeldt-Jakob disease and Alzheimer's disease: morphometric study and review of the literature. *Folia Neuropathol*, 50(1), 74-84.
- Wyss-Coray, T., Lin, C., Yan, F., Yu, G. Q., Rohde, M., McConlogue, L., Masliah, E., & Mucke, L. (2001). TGF-beta1 promotes microglial amyloid-beta clearance and reduces plaque burden in transgenic mice. *Nat Med*, 7(5), 612-618.
- Xu, M., Shibayama, H., Kobayashi, H., Yamada, K., Ishihara, R., Zhao, P., Takeuchi, T., Yoshida, K., Inagaki, T., & Nokura, K. (1992). Granulovacuolar degeneration in the hippocampal cortex of aging and demented patients--a quantitative study. *Acta Neuropathol*, 85(1), 1-9.
- Yamada, M., Noguchi-Shinohara, M., Hamaguchi, T., Nozaki, I., Kitamoto, T., Sato, T., Nakamura, Y., & Mizusawa, H. (2009). Dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease in Japan: clinicopathological and molecular characterization of the two distinct subtypes. *Neuropathology*, 29(5), 609-618.
- Yamanaka, K., Chun, S. J., Boillee, S., Fujimori-Tonou, N., Yamashita, H., Gutmann, D. H., Takahashi, R., Misawa, H., & Cleveland, D. W. (2008). Astrocytes as determinants of disease progression in inherited amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, 11(3), 251-253.

BIBLIOGRAFÍA

- Yokota, O., Tsuchiya, K., Oda, T., Ishihara, T., de Silva, R., Lees, A. J., Arai, T., Uchihara, T., Ishizu, H., Kuroda, S., & Akiyama, H. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis with dementia: an autopsy case showing many Bunina bodies, tau-positive neuronal and astrocytic plaque-like pathologies, and pallido-nigral degeneration. *Acta Neuropathol*, 112(5), 633-645.
- Young, J. K., Baker, J. H., & Muller, T. (1996). Immunoreactivity for brain-fatty acid binding protein in gomori-positive astrocytes. *Glia*, 16(3), 218-226.
- Young, J. K., McKenzie, J. C., & Baker, J. H. (1990). Association of iron-containing astrocytes with dopaminergic neurons of the arcuate nucleus. *J Neurosci Res*, 25(2), 204-213.
- Zanusso, G., Farinazzo, A., Fiorini, M., Gelati, M., Castagna, A., Righetti, P. G., Rizzuto, N., & Monaco, S. (2001). pH-dependent prion protein conformation in classical Creutzfeldt-Jakob disease. *J Biol Chem*, 276(44), 40377-40380.
- Zanusso, G., Monaco, S., Pocchiari, M., Caughey, B. (2016). Advanced test for early and accurate diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Nat Rev Neurol*, 12(6):325-33.
- Zarranz, J. J., Dignon, A., Atares, B., Rodriguez-Martinez, A. B., Arce, A., Carrera, N., Fernandez-Manchola, I., Fernandez-Martinez, M., Fernandez-Maiztegui, C., Forcadas, I., Galdos, L., Gomez-Esteban, J. C., Ibanez, A., Lezcano, E., Lopez de Munain, A., Marti-Masso, J. F., Mendibe, M. M., Urtasun, M., Uterga, J. M., Saracibar, N., Velasco, F., & de Pancorbo, M. M. (2005). Phenotypic variability in familial prion diseases due to the D178N mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 76(11), 1491-1496.
- Zeidler, M., Johnstone, E. C., Bamber, R. W., Dickens, C. M., Fisher, C. J., Francis, A. F., Goldbeck, R., Higgo, R., Johnson-Sabine, E. C., Lodge, G. J., McGarry, P., Mitchell, S., Tarlo, L., Turner, M., Ryley, P., & Will, R. G. (1997). New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features. *Lancet*, 350(9082), 908-910.
- Zeidler, M., Sellar, R. J., Collie, D. A., Knight, R., Stewart, G., Macleod, M. A., Ironside, J. W., Cousens, S., Colchester, A. C., Hadley, D. M., & Will, R. G. (2000). The pulvinar sign on magnetic resonance imaging in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 355(9213), 1412-1418.
- Zeidler, M., Stewart, G. E., Barraclough, C. R., Bateman, D. E., Bates, D., Burn, D. J., Colchester, A. C., Durward, W., Fletcher, N. A., Hawkins, S. A., Mackenzie, J. M., & Will, R. G. (1997). New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests. *Lancet*, 350(9082), 903-907.
- Zerr, I., & Parchi, P. (2018). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Handb Clin Neurol*, 153, 155-174.

BIBLIOGRAFÍA

- Zerr, I., Schulz-Schaeffer, W. J., Giese, A., Bodemer, M., Schroter, A., Henkel, K., Tschampa, H. J., Windl, O., Pfahlberg, A., Steinhoff, B. J., Gefeller, O., Kretzschmar, H. A., & Poser, S. (2000). Current clinical diagnosis in Creutzfeldt-Jakob disease: identification of uncommon variants. *Ann Neurol*, *48*(3), 323-329.
- Zhang, D., Hu, X., Qian, L., O'Callaghan, J. P., & Hong, J. S. (2010). Astrogliosis in CNS pathologies: is there a role for microglia? *Mol Neurobiol*, *41*(2-3), 232-241.
- Zhao, Z., Nelson, A. R., Betsholtz, C., & Zlokovic, B. V. (2015). Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. *Cell*, *163*(5), 1064-1078.
- Zhu, C., Herrmann, U. S., Falsig, J., Abakumova, I., Nuvolone, M., Schwarz, P., Frauenknecht, K., Rushing, E. J., & Aguzzi, A. (2016). A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J Exp Med*, *213*(6), 1047-1059.
- Zou, W. Q., Puoti, G., Xiao, X., Yuan, J., Qing, L., Cali, I., Shimoji, M., Langeveld, J. P., Castellani, R., Notari, S., Crain, B., Schmidt, R. E., Geschwind, M., Dearmond, S. J., Cairns, N. J., Dickson, D., Honig, L., Torres, J. M., Mastrianni, J., Capellari, S., Giaccone, G., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Cohen, M., Perry, G., Kong, Q., Parchi, P., Tagliavini, F., & Gambetti, P. (2010). Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein. *Ann Neurol*, *68*(2), 162-172.
- Zuhlke, C., Riess, O., Bockel, B., Lange, H., & Thies, U. (1993). Mitotic stability and meiotic variability of the (CAG)_n repeat in the Huntington disease gene. *Hum Mol Genet*, *2*(12), 2063-2067.