

Rodrigo Salomón Hernández Aco

El papel de la glía en la progresión de las enfermedades priónicas: estudio morfológico

Departamento
Patología Animal

Director/es

Badiola Díez, Juan José
Monzón Garcés, Marta

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



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

EL PAPEL DE LA GLÍA EN LA PROGRESIÓN DE LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS: ESTUDIO MORFOLÓGICO

Autor

Rodrigo Salomón Hernández Aco

Director/es

Badiola Díez, Juan José

Monzón Garcés, Marta

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

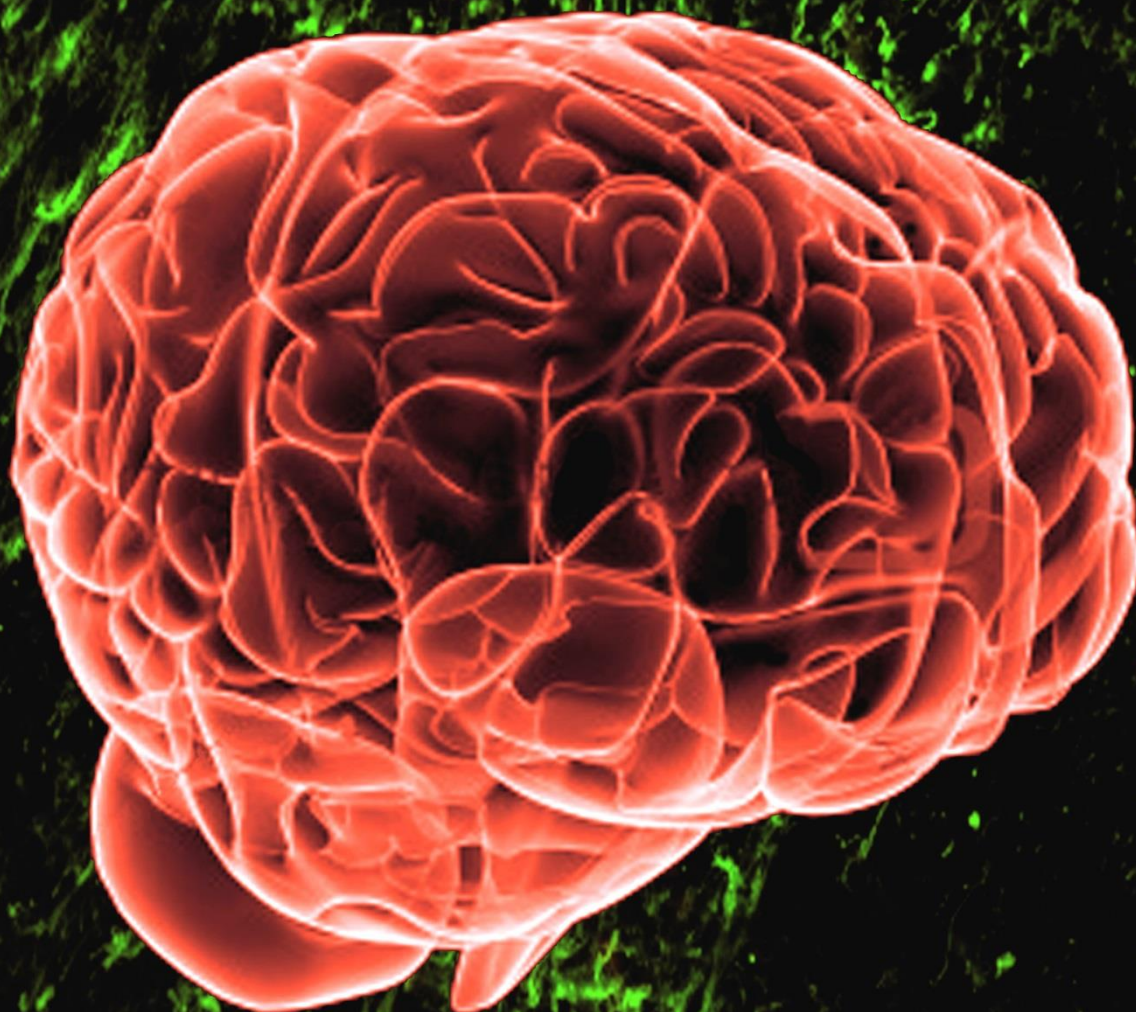
Patología Animal

2013



Centro de Investigación en
Encefalopatías y Enfermedades
Transmisibles Emergentes
Universidad Zaragoza

Departamento de Patología Animal
Facultad de Veterinaria



TESIS DOCTORAL

**EL PAPEL DE LA GLIA EN EL
PROGRESO DE LAS ENFERMEDADES
PRIÓNICAS:
ESTUDIO MORFOLÓGICO**

Rodrigo Salomon Hernández Aco

2013



**Universidad
Zaragoza**

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
DEPARTAMENTO PATOLOGIA ANIMAL**

**EL PAPEL DE LA GLIA EN LA
PROGRESION DE LAS ENFERMEDADES
PRIONICAS: ESTUDIO MORFOLOGICO**

MEMORIA PRESENTADA POR:

RODRIGO SALOMON HERNANDEZ ACO

PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA POR
LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

DIRIGIDA POR:

DRA. MARTA MONZÓN GARCÉS

DR. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ

ZARAGOZA, NOVIEMBRE 2013

LOS SACRIFICIOS TIENEN MUCHAS CARAS, PERO EL DOLOR QUE ME DEJO TU PARTIDA ME HA MARCADO POR EL RESTO DE MI VIDA, LAMENTO NO HABER SIDO UN MEJOR HIJO, PERO DE AHORA EN ADELANTE GRACIAS A TU CONFIANZA EN MI, TRATARE DE SER UN MEJOR HOMBRE....

GRACIAS PAPÁ

EJEMPLO DE TENACIDAD, FORTALEZA Y SACRIFICIO

GRACIAS A MI ESPOSA

MARGARITA

AGRADECIMIENTOS

A Juan José Badiola, por la oportunidad que me brindó para realizar investigación y conocer un mundo realmente impactante, por su estímulo para seguir adelante, por dirigirme en la realización de esta tesis y brindarme su amistad.

A Marta Monzón, por permitirme trabajar con ella, mostrarme la forma correcta de hacer las cosas y su motivación, pero sobre todo por sus enseñanzas y dirección en esta tesis.

A Cristina, Rosa, Antonia, Nico, y Eva por su ayuda y conocimientos, por su apoyo y compañía en los cafés, comidas y todos los momentos compartidos.

A Miguel, Charly y Maricruz por la suerte de conocerlos compartir una charla, por lo que he aprendido de ellos y por su amistad.

A José Luis, Carlos, Roció, Jessica, Belén y William por su ayuda, amistad y comprensión durante mi estancia, por los agradables momentos que compartimos juntos dentro y fuera del trabajo. Por todo lo que he aprendido de gente admirable como ellos.

A Icham, por su amabilidad, su apoyo y ánimo durante los momentos más difíciles de este trabajo, por compartir sus conocimientos y su ayuda para la maquetación de esta tesis.

A Silvia Ruiz, Nuria, Silvia Castejón, Sonia y Yolanda por su enorme ayuda para la realización de esta tesis, por su disposición y paciencia, por su entrega y trabajo para las pruebas realizadas para este estudio.

A Lourdes, África y personal del departamento, gracias por el apoyo durante el tiempo de mi estancia y trabajo para culminar la tesis.

A Margarita, por ser mi fortaleza durante este tiempo lejos de casa, por sus sacrificios de los cuales jamás podré agradecer lo suficiente, por ser mi esposa y mi mejor amiga.

A Lidia, mi suegra que desafortunadamente se adelantó en el viaje de la vida. Que antes de partir encontró la felicidad en compañía de su hija y nietos que la amarán por siempre.

A Alanis, Uriel y Axl, mis hijos que han sacrificado abrazos, besos y juegos por la distancia que implicó realizar este trabajo.

A Genaro Miranda, por su amistad durante todos esos años, su apoyo para lograr este objetivo y superar mis metas.

A Rocio y Emiliano, su amistad los buenos ratos y las enriquecedoras charlas que disfrutamos durante estos años.

A mi madre, hermanos y sobrinos por el apoyo recibido durante el tiempo de ausencia en casa, y motivación para la realización de mi tesis.

A todas las personas que conocí durante mi estancia en España, que de alguna manera formaron parte de este proyecto.

A el Banco Santander y la Universidad de Zaragoza por permitir mi estancia de investigación mediante la concesión de una beca de ayuda para la realización del doctorado.

INDICE

INDICE

I.	INTRODUCCION	1
II.	OBJETIVOS	3
III.	REVISION BIBLIOGRAFICA	5
I.1.	ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES.....	5
I.2.	SCRAPIE.....	11
I.3.	LA ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB	14
I.3.1.	ECJ genético.....	14
I.3.2.	ECJ esporádica.....	14
I.3.3.	Subtipo 1 (MM1 y MV1)	15
I.3.4.	Subtipo 2 (VV2).....	16
I.3.5.	Subtipo 3 (MV2).....	16
I.3.6.	Subtipo 4 (MM2)	16
I.3.7.	Subtipo 5 (VV1).....	17
I.3.8.	Subtipo 6 (insomnio fatal esporádico)	17
I.3.9.	ECJ infeccioso (iatrogénico y variante)	17
I.3.10.	Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vECJ)	18
I.4.	CEREBELO	19
I.5.	NEUROGLIA	23
I.5.1.	Astroglía	¡Error! Marcador no definido.
I.5.2.	Gliosis	27
I.6.	TÉCNICAS	36
IV.	MATERIAL Y METODOS	43
IV.1.	PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	47
IV.2.	TINCION HEMATOXILINA-EOSINA.....	48
IV.3.	INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETECCION DE LA PrP ^{Sc}	48
IV.4.	INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA DETECCIÓN DE GFAP	49
IV.5.	INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETECCION DE MICROGLIA.....	50
IV.6.	INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA VISUALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL	51
IV.7.	PROCEDIMIENTO PARA VISUALIZACION MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.....	52
V.	RESULTADOS	55

V.1. SCRAPIE	55
I.6.1. Análisis histopatológico (H/E).....	55
I.6.2. Detección de PrPsc.....	57
I.6.3. Detección de GFAP.....	60
I.6.4. Detección de microglía reactiva	62
I.6.5. Estudios de doble marcaje (astroglía y microglía reactiva) mediante microscopia confocal.....	65
V.2. ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT JAKOB	66
I.6.6. Analisis histopatológico (H/E).....	66
I.6.7. Deteccion de GFAP.....	72
I.6.8. Microgliosis.....	76
I.6.9. Microscopia confocal.....	80
VI. D ISCUSION.....	83
VII. CONCLUSIONES.....	99
VIII. RESUMEN	101
IX. ÍNDICE DE TABLAS.....	109
X. ÍNDICE DE FIGURAS	109
XI. BIBLIOGRAFIA.....	111

INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas que se caracterizan por presentar largos periodos de incubación, cursar con trastornos neurológicos progresivos y un desenlace fatal en todos los casos. Éstas se asocian a la acumulación de la proteína prión patológica (PrPsc) en determinadas áreas específicas del sistema nervioso central (SNC) donde además se observa vacuolización, pérdida neuronal y gliosis.

El Scrapie, que afecta a la especie ovina y caprina, fue la primera EET descrita en el siglo XVIII y continúa siendo endémica a nivel mundial y se ha utilizado como el prototipo de este grupo de enfermedades.

La identificación de diferentes características fenotípicas en relación con el agente causal ha llevado a utilizar el término cepa o tipo. En el caso concreto de ECJ se han caracterizado cuatro tipos diferentes en función de sus características clínico-patológicas y el fenotipo que presentaban en el codón 129.

Teniendo en cuenta las principales manifestaciones clínicas de las EET, entre las que destaca la ataxia, y la diversidad de áreas que mantienen relación con el agente causal se consideró oportuno enfocar los estudios en la zona del cerebelo. Tradicionalmente, se ha considerado que el cerebelo participaba esencialmente en la coordinación y el control motor. Sin embargo, en las últimas décadas ha cobrado fuerza el concepto del cerebelo como un órgano relacionado no sólo con funciones motoras, sino también con otros procesos cognitivos.

INTRODUCCION

A pesar de los recientes hallazgos que sugieren un posible papel de la neuroglía en las enfermedades neurodegenerativas se desconoce la contribución de estos tipos de células en dichos procesos.

La gliosis (proliferación microglial y astrogial) se ha descrito en la ECJ y en el Scrapie, por lo que resulta de interés valorar su papel real en estas EET. En concreto, en los modelos naturales de ECJ y Scrapie con el objeto de determinar la variabilidad en relación con la especie.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es demostrar el papel que tiene la glía en la evolución de las EET. Para ello, los objetivos concretos que se plantean son:

- ❖ Determinar la posible relación entre la astrogliosis y los perfiles neuropatológicos observados en diferentes casos de Scrapie natural en diferente estadio de la enfermedad (pre-clínico, clínico y terminal).
- ❖ Demostrar si diferentes variables como la edad o el genotipo del animal, o el foco del que proceden los casos de Scrapie, influyen en la relación que haya sido establecida en el objetivo 1.
- ❖ Conocer la posible relación entre la microgliosis y los perfiles neuropatológicos observados en los diferentes estadios de la enfermedad de Scrapie natural, valorando también las mismas variables que en el objetivo 2 (edad, genotipo y foco).
- ❖ Valorar los patrones de distribución de la astrogliosis asociada a diferentes casos procedentes de enfermos de ECJ.
- ❖ Estudiar los posibles cambios relacionados con la distribución y morfología de las células de la microglía que puedan existir en diferentes casos de ECJ.

REVISION BIBLIOGRAFICA

III. REVISION BIBLIOGRAFICA

I.1. ENCEFALOPATIAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), conocidas también como enfermedades priónicas, son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, con pronóstico fatal en todos los casos, que afectan al ser humano y algunas especies animales.

Aunque la vía de transmisión difiere según el tipo de EET, todas ellas se asocian a la acumulación de la proteína prión patológica (PrPsc) en determinadas áreas específicas del sistema nervioso central (SNC) y se caracterizan por presentar largos periodos de incubación, cursar con trastornos neurológicos progresivos acompañados de déficit cognitivo, sensorial y motor y no generar respuesta inmunitaria ni inflamatoria (Prusiner 1997).

Las alteraciones neuropatológicas observadas en las EET son pérdida neuronal, gliosis y cambio espongiforme inducido por vacuolización, siendo este último la principal característica de este grupo de enfermedades junto con la acumulación de la PrPsc (DeArmond *et al.* 2003). De hecho, el diagnóstico de este grupo de enfermedades se realiza mediante el examen histopatológico y la detección de PrPsc utilizando la inmunohistoquímica o el *Western Blot*.

La PrPsc es una isoforma anormal de la proteína prión celular (PrPc), que en estado fisiológico se localiza principalmente en el tejido nervioso, y que al sufrir un cambio de conformación que altera su estructura terciaria y adquirir un incorrecto plegamiento, se convierte en patológica (Martins *et al.* 2002). Cuando la PrPsc entra en un organismo actúa sobre la isoforma normal (PrPc) existente, induciendo su conversión. Este cambio conformacional conlleva un cambio de

determinadas características. En concreto, la PrPsc presenta una mayor proporción de estructura, es resistente a proteasas, así como a la mayoría de métodos de descontaminación (físicos y químicos) y es insoluble en detergentes (Prusiner 1998; Mathews *et al.* 2002);(Tabla 1).

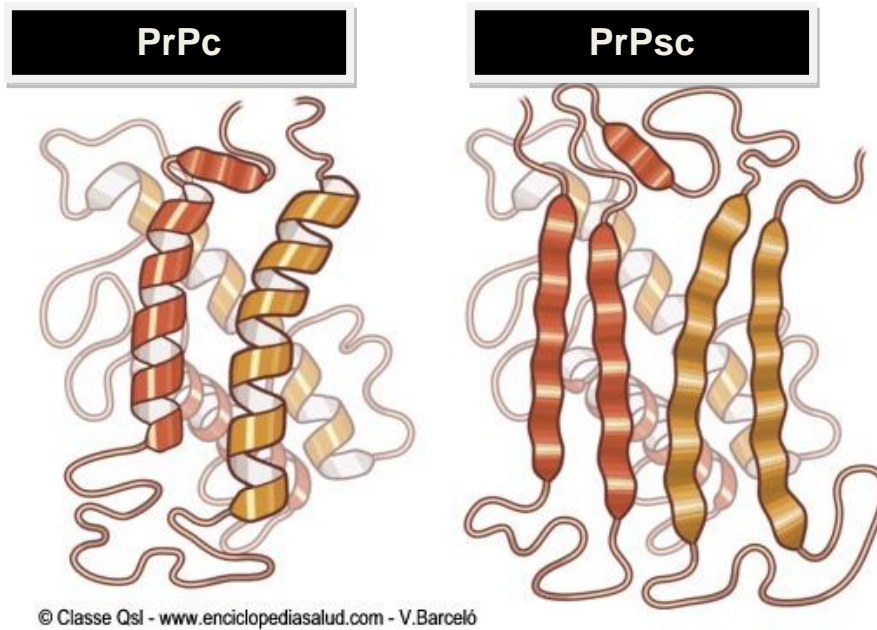


Tabla 1: Principales diferencias entre la PrPc y la isoforma patológica PrPsc

PrPc	PrPsc
Estructura hélice α (4 regiones de proteína globular)	Estructura lámina β (proteína plana)
Sensible a proteasas	Resistente a proteasas
Proteína monomérica	Agregados proteicos
Resistencia normal	Resistencia extrema a la radiación y disolventes
Soluble en detergentes	Insoluble en detergentes

(Mathews *et al.* 2002)

Una característica que resulta muy interesante de las enfermedades priónicas es su heterogeneidad en la expresión fenotípica. Se ha propuesto que esta heterogeneidad podría estar relacionada con las variaciones en la estructura terciaria de la PrPsc, mostrando diferentes conformeros de la proteína anormal y presentando propiedades físico-químicas y patogénicas distintas

(Safar *et al.* 1998). Esta hipótesis se apoya en la observación de diferencias en relación con el tamaño molecular del fragmento proteico resistente a proteasas, que podrían ser resultado de diferentes sitios de división proteolítica que estén reflejando las diferentes estructuras terciarias (Bessen *et al.* 1994; Parchi *et al.* 1996).

Por ejemplo, la heterogeneidad clinicopatológica de la forma esporádica de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJe) se ha relacionado con 2 tipos de PrPsc, denominados tipo 1 y tipo 2, con pesos moleculares de 21 y 19 kDa, respectivamente (Parchi *et al.* 1996; Notari *et al.* 2004). La evidencia sugiere que la PrPsc en combinación con el genotipo para el gen que codifica la proteína prión (PRNP codón 129), un sitio polimórfico común que codifica metionina o valina, determinan el patrón de distribución regional de la PrPsc en el encéfalo (Parchi *et al.* 1996; Notari *et al.* 2004).

El daño que ocasiona la presencia de esta proteína patológica en el tejido del SNC, parece deberse a su acumulación en el neuropilo y/o en el pericarion neuronal (Press *et al.* 2004). Así, la vacuolización neuronal y/o del neuropilo en ciertas zonas del encéfalo que se observa en todos los casos en los individuos afectados, parece ser la consecuencia de la acumulación de dicha proteína, implicando alteraciones neurológicas y motrices. Como consecuencia de estas lesiones el individuo afectado muere irremediablemente (Roucou *et al.* 2004);(Rodriguez 2007).

Se han descrito varios tipos de EET animales, destacando entre ellas el *Scrapie* en ovinos y caprinos y la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) (Tabla 2). El *Scrapie* es conocido hace más de 200 años y presenta una

distribución mundial (Hadlow *et al.* 1982; Hourrigan *et al.* 1996; Schwartz 2003), incluyendo Nueva Zelanda y Australia, donde se han descrito los primeros casos de Scrapie atípico en 2009 y 2010 respectivamente (Kittelberger *et al.* 2010).

La EEB fue descrita en el Reino Unido en 1985, provocando una gran epidemia (hasta 1000 casos por semana en 1993) que afectó a Europa y posteriormente a otros países. Los estudios epidemiológicos revelaron que la alimentación de estos animales parecía ser la fuente de contaminación por contener harinas procesadas con restos de animales afectados con Scrapie. Se pudo demostrar que durante los años 1981 y 1982 se había introducido harinas contaminadas en la alimentación de bóvidos, estimando así que el tiempo de incubación era de 5 años aproximadamente, desde que la proteína entraba a través de la vía digestiva y la aparición de los primeros síntomas neurológicos (Anderson *et al.* 1996; Collee *et al.* 1997).

Tabla 2: Encefalopatías espongiformes transmisibles descritas en los animales

EET en animales
<ul style="list-style-type: none">• Scrapie en ovejas y cabras• Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)• Encefalopatía Espongiforme felina, en gatos domésticos y salvajes• Encefalopatía espongiforme del visón• Enfermedad crónica debilitante, en ciervos, alces y antílopes• Encefalopatía de ungulados exóticos

Por otra parte, las enfermedades priónicas humanas constituyen un grupo singular de trastornos neurológicos que incluyen el Kuru, el síndrome

Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar fatal (IFF) (Pocchiari *et al.*) y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), con sus 4 tipos diferentes: familiar, iatrogénica, esporádica y variante (Tabla 3). La relación entre la variante de ECJ (vECJ), descrita por primera vez en 1996 (Collinge *et al.* 1996), y la EEB logró aumentar el interés por el conocimiento de este grupo de enfermedades al confirmarse su carácter zoonótico.

El síndrome GSS fue descrito por primera vez en 1936, considerándose una variante de la ECJ familiar asociada principalmente a mutaciones del gen PRNP en el codón 102. Sin embargo existen varias mutaciones que condicionan diversos síntomas clínicos, la edad de inicio y la duración de la enfermedad. La principal característica neuropatológica de esta enfermedad es la aparición de placas amiloides de PrPsc (Kretschmar 1993; Richardson *et al.* 1995).

El IFF fue descrito en 1939 como una enfermedad que provoca demencia progresiva y degeneración simétrica bilateral del tálamo (Stern 1939). Posteriormente, se asoció a trastornos del sueño que conducían a insomnio intratable, manifestando disfunción del sistema nervioso autónomo y mioclonias. En este caso, la mutación del gen del PRNP en el codón 178 conduce a la generación de PrPsc (Medori *et al.* 1992). La enfermedad aparece alrededor de los 50 años y tiene un tiempo de duración que varía entre los 5 y los 15 meses (Lugaresi *et al.* 1986).

Las EET esporádicas (85% de los casos) incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica y el insomnio letal esporádico. Las EET familiares (10-15%) incluyen la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar, el insomnio letal familiar y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker. Las EET

adquiridas (<5%) incluyen el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica y la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob. Los síntomas primarios comunes en todos los casos son el deterioro de las habilidades cognitivas, pérdida de memoria, ataxia y distorsiones visuales (Brown *et al.* 1994; Parchi *et al.* 1999);(Tabla 4). En la progresión de la enfermedad se presentan también demencia y mioclonias. Presentan las mismas características neuropatológicas que el resto de EET (vacuolización, pérdida neuronal, acumulación de PrPsc y gliosis), constituyendo la base del diagnóstico de este grupo de enfermedades durante muchos años, aunque se considera que estos cambios son variables de un caso a otro, e incluso de una región del SNC a otra en un mismo individuo (Ironsides 1996).

Tabla 3: Enfermedades priónicas humanas. En la columna de etiología, la fuente probable de infectividad se muestra entre paréntesis. (Head *et al.* 2012)

Las enfermedades priónicas humanas	
Enfermedad priónica humana	Etiología probable
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJs) y sus subtipos	Idiopática
Insomnio fatal esporádico (IFE)	Idiopática
Prionopatía Variable sensible a proteasas (VPSPr)	Idiopática
Kuru	Adquirida (sCJD)
ECJ iatrogénica (ECJi)	Adquirida (sCJD)
Variante ECJ (ECJv)	Adquirida (EEB)
ECJ familiar o genética (ECJf o ECJg)	Genética (mutaciones PRNP)

REVISION BIBLIOGRÁFICA

Enfermedad Gerstmann-Straussler-Scheinker (GSS)	Genética (mutaciones PRNP)
El insomnio familiar fatal (FFI)	Genética (mutaciones PRNP)
Angiopatía proteína prión amiloide cerebral (PrP-CAA)	Genética (mutaciones PRNP)

Tabla 4. Resumen de los parámetros utilizados para evaluación clínica (Cartier *et al.* 2012).

Cambios conductuales y cognitivos	Quiebre de la personalidad
	Alteración de conducta
	Cambios cognitivos
Vigilancia y sueño	Alteración del lenguaje y/o habla
	Cambio de la alerta
	Alucinaciones
Compromiso visual	Perturbaciones de la visión
	Amaurosis
	Inestabilidad de la marcha
Compromiso motor	Temblor de reposo
	Distonías y diskinesias
	Síndrome cerebeloso
Fenómenos mioclónicos y epilépticos	Déficit motor focal
	Mioclónías
	Convulsiones

Puesto que el presente trabajo se ha desarrollado en dos modelos naturales, uno animal y otro humano, a continuación se incluye una descripción de las principales características de cada uno de ellas.

I.2. SCRAPIE

Es una enfermedad no zoonótica del grupo de las EET que afecta a las especies ovina y caprina. Fue descrita por primera vez en Inglaterra en 1732 (aunque no existe documento escrito de ello, Comber en una publicación en 1772 asumía la descripción de esta enfermedad 40 años antes (Stamp 1962), y posteriormente fue detectado en otros países europeos que lo denominaron (*tremblante*) en Francia, prurigo lumbar en España o *traberkrankheit* (enfermedad del trote) en Alemania. El periodo de incubación varía entre 2 y 5

años según cada individuo, presentando un cuadro clínico de curso lento (2 a 6 meses) que se caracteriza por tres manifestaciones destacadas:

1.- Alteración del comportamiento: los animales se separan del rebaño, se mantienen aislados y manifiestan reacciones anormales, muestran fases de depresión, estado de alerta y en ocasiones, miedo que se puede confundir con agresividad.

2.- Intenso prurito: se asocia por constantes lamidos, mordiscos y rascado con apoyo en paredes y objetos fijos, ocasionando depilaciones de lana y heridas cutáneas, en zonas dorsal, lumbar, flancos, base de la cola, extremidades y cara.

3.- Ataxia progresiva: se observa cuando existe incapacidad de realizar movimientos coordinados, afectando los miembros posteriores y consecutivamente los anteriores, provocando un trote característico, que se agrava ocasionando la postración del animal.

Frecuentemente los animales presentan alteraciones posturales, rechinar de dientes, movimientos hipermétricos de miembros anteriores, temblores musculares mioclónicos de cabeza, cuello y extremidades, deterioro físico progresivo, adelgazamiento, postración y muerte (Lampert *et al.* 1972; García de Jalón *et al.* 1987).

El diagnóstico diferencial se realiza principalmente respecto a enfermedades como la listeriosis, toxemia, poliencfalomalacia y Visna Maedi. La transmisión es horizontal, a través de la ingestión de pastos o piensos

contaminados, y vertical, a través de la placenta y otros fluidos (Shaked *et al.* 2001).

En esta enfermedad se ha demostrado infectividad en los tejidos periféricos desde los 4 meses post-infección (Ponz *et al.* 2002). En el intestino, a nivel de la placa de Peyer ileal, las células M adyacentes parecen jugar un papel importante, al captar la proteína sin degradarla y presentarla como antígeno al sistema linforreticular (SLR). Así, la proteína resistente a las proteasas (PrPsc) pasa a través del SLR con implicación de las células macrofágicas y dendríticas foliculares donde puede replicarse (Mabbott *et al.* 2001). El agente causal de estas enfermedades pasa al SNC a través de una de las siguientes rutas: directa a través del sistema nervioso periférico (SNP) o indirectamente, por el sistema linforreticular (Beekes *et al.* 2000; Mabbott *et al.* 2001).

La neuroinvasión varía dependiendo del agente causal y de la genética del hospedador (Beekes *et al.* 2000);(Glatzel *et al.* 2000);(Van Keulen *et al.* 2002);(Heggebo *et al.* 2003). En concreto, el genotipo que presenta el animal para el gen PRNP en los codones 136, 154 y 171 está asociado a la susceptibilidad o resistencia del animal a la enfermedad. El alelo VRQ es el más relacionado con la susceptibilidad del Scrapie, mientras que los alelos ARR y AHQ aumentan la resistencia a ella (Belt *et al.* 1995). En los ovinos que portan los genotipos más resistentes en el codón 136 (ARR) se sabe que la implicación del SLR en la replicación del prión es muy pequeña y la neuroinvasión ocurre sin la acumulación de PrPsc en este sistema (Jeffrey *et al.* 2002) .

I.3.LA ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT-JAKOB

La ECJ se puede presentar bajo tres formas diferentes en relación con su etiología: genética esporádica o infecciosa (Ironsides 1996);(Prusiner 1998).

I.3.1. ECJ genético

La causa más frecuente de ECJ familiar es la mutación en el codón E200K y está producida por la sustitución de ácido glutámico por lisina en el codón 200. Presenta una marcada expresividad con penetrancia incompleta en función de la edad, siendo del 1% a los 40 años y del 99% a los 80 (Pinel *et al.* 2011). Esta mutación aparece en más del 70% de casos de familias con ECJ hereditaria en todo el mundo. Esta enfermedad tiene un muy variado fenotipo clínico-patológico, incluyendo la mutación del gen PRNP en el codón 129 (Kovacs *et al.* 2002).

I.3.2. ECJ esporádica

Se trata de la enfermedad más común en este grupo de enfermedades. Se considera que su tasa de incidencia es de alrededor de 1,5 casos por millón y año (Brown *et al.* 1987). Se desconocen las causas, aunque se ha sugerido el efecto ambiental o sucesos aleatorios que resulten en la producción espontánea de PrPsc en el encéfalo (Brown *et al.* 1987; Ironsides 1996).

Existen también formas de la enfermedad menos comunes o atípicas, entre las que destacan la enfermedad de Brownell-Oppenheimer (síndrome cerebelar puro) y el síndrome de Heidenhain's (discapacidad visual pura, que conduce a la ceguera cortical), teniendo esta última una patogenicidad progresiva que

conduce al individuo a un estado clínico pre-terminal similar a la ECJ típica (Pocchiari *et al.* 2004; Cooper *et al.* 2006).

La genética de cada individuo parece ser un factor importante en el desarrollo de la ECJe. Un mayor porcentaje de la población caucásica normal es heterocigoto (MV) para el codón 129 (Alperovitch *et al.* 1999; Parchi *et al.* 1999), mientras que existe una cierta predominancia de homocigotos para metionina (MM) en los enfermos (Goldfarb *et al.* 1994; Prusiner 1998).

Esta enfermedad afecta principalmente a personas con edades comprendidas entre los 65 y 70 años, independientemente del sexo. La mayoría manifiestan demencia progresiva y otros trastornos neurológicos descritos en el resto de EET. La enfermedad avanza rápidamente y los pacientes mueren en un periodo de tiempo de 4 a 6 meses tras la aparición de los primeros síntomas (Brown *et al.* 1987; Alperovitch *et al.* 1999; Knigth *et al.* 2004).

Recientemente, algunos informes relativos a la coexistencia de más de una proteína prión anormal en el encéfalo han obligado a revisar la clasificación clínico-patológico-molecular de la ECJ (Cali *et al.* 2009; Parchi *et al.* 2009). En concreto, se han identificado seis subtipos de ECJe con distintivos rasgos clínico-patológicos, tipos de PrPsc y estado polimórfico del codón 129 para el gen PRNP (Parchi *et al.* 1996; Parchi *et al.* 1999).

I.3.3. Subtipo 1 (MM1 y MV1)

Este subtipo se observa en pacientes que son MM homocigotos o MV heterocigotos y presentan PrPsc de tipo 1. La duración clínica es corta, 3 ó 4

meses (Gambetti *et al.* 2003), comúnmente consistente en pérdida cognitiva y signos visuales de ceguera cortical (Síndrome de Heidenhain's).

I.3.4. Subtipo 2 (VV2)

Es el subtipo más común, representando cerca del 16% de todos los casos (Gambetti *et al.* 2003). El promedio de edad de las personas afectadas es de 60 años y la duración clínica se aproxima a los 6 meses, con un rango entre los 3 y 18 meses. Las características neuropatológicas varían fundamentalmente en relación con las zonas de espongiosis observadas; concretamente, las afectaciones más severas se observan en las regiones caudales del cerebro y en la región rostral, con rasgos distintivos de inmunoreactividad en cerebelo y células de Purkinje (Sikorska *et al.* 2012).

I.3.5. Subtipo 3 (MV2)

Conocido como el síndrome de Beti Brownell/Oppenheimer, se observa en el 9-10% de los casos. Tiene una duración de 17 meses aproximadamente, y una presentación clínica y neuropatológica similar al subtipo VV2 (Sikorska *et al.* 2012).

I.3.6. Subtipo 4 (MM2)

Se presenta en personas con un promedio de 65 años de edad y afecta a un 2-8% de los casos, con una duración media de la enfermedad de 16 meses. El síntoma más frecuentemente observado en este subtipo son la afasia y el deterioro cognitivo. Las características neuropatológicas muestran vacuolas más grandes que las observadas en el subtipo 1 y se localizan principalmente en la corteza cerebral, ganglio basal y tálamo. La inmunohistoquímica muestra

depósito alrededor de las vacuolas, mientras que la formación de placas no es común en este subtipo (Sikorska *et al.* 2012).

I.3.7. Subtipo 5 (VV1)

Se trata del menos frecuente de los subtipos, afectando sólo al 1% de los casos. El rango de edad de presentación de los síntomas oscila entre los 24 y los 49 años y la duración de la enfermedad aproximada es de 15 meses. Se conoce como ECJ de inicio temprano. Lo más destacable sobre las lesiones neuropatológicas de este subtipo radica en la afectación de la corteza del hipocampo, siendo las regiones menos afectadas el tálamo y el cerebelo (Parchi *et al.* 1999; Gambetti *et al.* 2003).

I.3.8. Subtipo 6 (insomnio fatal esporádico)

Se trata de otro infrecuente subtipo que se detecta en el 2% de todos los casos de las enfermedades priónicas esporádicas, de hecho, sólo existen unos pocos casos descritos. El fenotipo es indistinguible del insomnio familiar fatal (IFF), de ahí el nombre de insomnio fatal esporádico (Mastrianni *et al.* 1999; Parchi *et al.* 1999);(Sikorska *et al.* 2012). Las lesiones más relevantes se localizan en el tálamo, en los núcleos que forman parte del sistema límbico, en el núcleo medial dorsal y en el núcleo ventral anterior (Netter 2003).

I.3.9. ECJ infeccioso (iatrogénico y variante)

Surgió como consecuencia del uso de derivados procedentes de cadáveres humanos como hormonas del crecimiento o injertos de dura madre. En 1985, fueron descritos como casos inusuales de ECJ en individuos que habían recibido este tipo de hormona de cadáveres 10 a 15 años antes.

Basados en la presencia de la PrPsc y la relación con la edad de inicio y exposición semejantes a las descritas en la ECJe, se concluyó que procedía del uso de hormonas; (Gardner *et al.* 2007); (Sikorska *et al.*, 2012). Los casos iatrogénicos resultantes del uso de la hormona de crecimiento están asociados con el genotipo homocigoto Valina/Valina en este codón 129. Mientras, los casos de la variante ECJ han sido descritos en individuos homocigotos Metionina/Metionina (Pinel *et al.* 2011).

Resulta interesante señalar que la cirugía puede ser una vía de transmisión de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe). En muchos procedimientos quirúrgicos invasivos, los instrumentos no desechables entran en contacto con los tejidos que se sabe que son infecciosos. Estos mismos instrumentos pueden retener un considerable nivel de infectividad tras la esterilización de rutina y en pacientes en los que son utilizados posteriormente pueden entrar en contacto con los tejidos que actúan como vías de entrada para la transmisión de la enfermedad (Rabano *et al.* 2005).

I.3.10. Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (vECJ)

Esta variante afecta mayoritariamente a la población joven de manera significativa (media de 28 años de edad) y tiene un progreso relativamente lento, con una duración de unos 14 meses. Los síntomas son notablemente psiquiátricos y conductuales, observándose una clara ausencia de funciones neurológicas (Spencer *et al.* 2002). Todos los casos descritos de vECJ como los confirmados, probables y posibles (basados en los criterios internacionales) se observaron en individuos Metionina/Metionina para el gen PRNP en el codón 129 (Criterios diagnósticos de las EETH. Junio 2003).

La neuropatología en estos casos consiste fundamentalmente en atrofia de la región cortical del cerebro y cerebelo (Ironsides *et al.* 2002). En contraste con otras formas de enfermedades priónicas humanas, en los casos de vECJ es posible detectar la PrPsc en los tejidos neurales periféricos, incluyendo ganglios sensitivos y autónomos (Shimizu *et al.* 1999; Head *et al.* 2004).

La identificación del agente causal de la vECJ, idéntico al de la EEB en el ganado bovino, evidenció la relación entre ambas enfermedades, justificando el origen de la variante humana en base al consumo de productos de bovinos contaminados con EEB (Bruce *et al.* 1997). La vECJ es por lo tanto, la enfermedad priónica humana que representa la forma infecciosa capaz de atravesar la barrera entre especies, utilizando la vía oral como principal ruta de transmisión (Ward *et al.* 2006).

I.4. CEREBELO

Como ya se ha adelantado en la introducción, el trabajo realizado se ha llevado a cabo sobre tejido cerebelar. Teniendo en cuenta, por un lado, su importancia en relación con las manifestaciones clínicas de la enfermedad, y por otro, que se trata de una región donde es posible observar las lesiones características de la enfermedad independientemente del agente causal, se consideró oportuno enfocar los estudios en esta zona encefálica.

El cerebelo es la región del encéfalo que integra la información procedente de las vías sensitivas y las vías motoras. Tras recibir e integrar toda la información recibida desde la corteza cerebral, dirige la respuesta al sistema locomotor a través de las vías motoras. De esta manera, regula la coordinación y

el mantenimiento de la actividad muscular, así como del equilibrio (Delgado-García 2001).

Situado sobre del IV ventrículo, constituye parte del mismo junto al bulbo y el puente. Está inmerso por líquido cerebroespinal, donde se forma la cisterna magna. Apoyado con el tronco encefálico mediante los pedúnculos cerebelosos, en los mamíferos el cerebelo está formado por una sucesión de folios o láminas que se emplazan de manera transversal al eje longitudinal del tronco encefálico (Llinas *et al.* 1990).

El cerebelo está formado por seis lóbulos cerebelosos: 2 superiores, que conectan al mesencéfalo a los pedúnculos cerebrales; 2 medios, que conectan al puente; y 2 inferiores, que conectan al bulbo (Fig. 5).

Al igual que en el resto de las regiones del encéfalo, el cerebelo está constituido por sustancia gris y sustancia blanca. La sustancia gris se localiza en la superficie, formando la corteza cerebelosa, que cubre la superficie del cerebelo y se compone de tres capas. La capa molecular (la más superficial) que se conecta con los axones de las células granulares formando sinapsis en las dendritas de las células de Purkinje.

El pericarion de las células de Purkinje distribuidas a lo largo de la superficie profunda de la capa molecular constituye la capa intermedia de la sustancia gris del cerebelo. Y la capa más profunda, está constituida principalmente por células granulares que se observan en forma de núcleos densamente poblados de neuronas muy pequeñas (Delgado-García 2001; Beitz JA 2010).

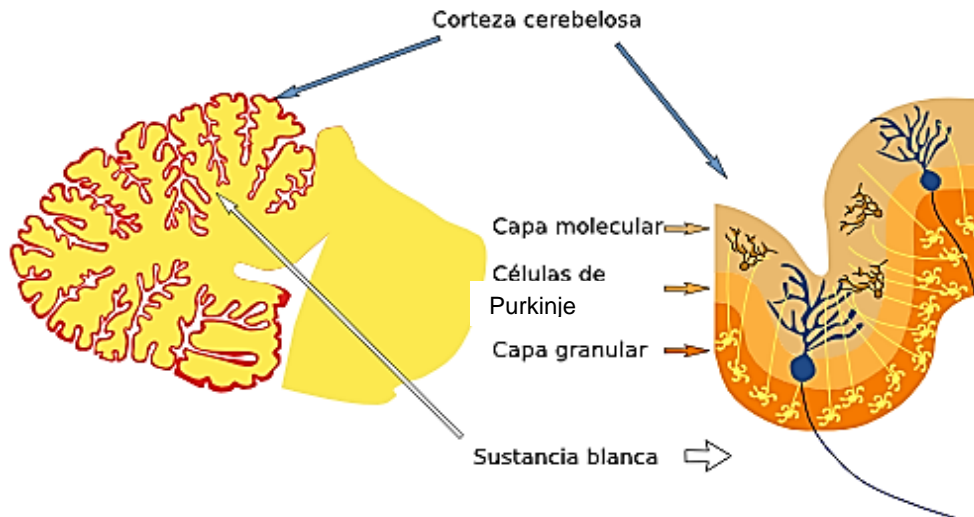


Fig. 1 Esquema de un corte transversal de cerebelo animal. **NEUROANATOMIA** (Puelles 2008) Editorial Panamericana.

Las células de Purkinje son las neuronas más grandes del encéfalo, presentan amplias ramificaciones dendríticas, perpendiculares y paralelas a la longitud del *folium*, que forman parte de la capa molecular. Sus axones llegan a la sustancia blanca formando sinapsis en los núcleos cerebelares (núcleos vestibulares).

Los axones de las células de Purkinje participan en las sinapsis como neurotransmisores liberando GABA de forma inhibitoria (Beitz JA 2010). Las células de la capa granular son neuronas excitatorias de la corteza cerebelar, liberando glutamato como neurotransmisor. Los axones de las células granulares pasan por la capa molecular en forma de fibras paralelas, a lo largo del *folium*, realizando sinapsis con las neuronas de Purkinje (Beitz JA 2010).

En la capa molecular se encuentran las células estrelladas y las células en cesto; las primeras ocupan una posición más superficial que las segundas. Tanto las células estrelladas como las en cesto, extienden sus axones en el plano sagital, pero se diferencian en que las estrelladas hacen sinapsis con las

dendritas distales de las células de Purkinje, mientras que el axón de las células en cesto se extienden lateralmente por encima de los cuerpos de las células de Purkinje y emite profusas ramificaciones sobre cada uno de estos, de manera que se forma una especie de canastilla o cesto que los envuelve casi completamente (Delgado-Garcia 2001).

El soma de las células de los granos se localiza en la capa granular y su axón asciende perpendicular a la superficie cerebelosa y se ramifica en forma de T en la capa molecular, unos 2-3 mm, en ambas direcciones del eje longitudinal del folio. Así, cada fibra paralela se extiende perpendicularmente entre los espacios que deja el árbol dendrítico y hace sinapsis en su recorrido con 20-30 de ellas. A su vez, cada célula de Purkinje recibe contactos sinápticos de las fibras paralelas. Las fibras trepadoras terminan también en la capa molecular siguiendo las ramificaciones de las dendritas de cada célula de Purkinje (Delgado-Garcia 2001);(Beitz JA 2010).

En la corteza cerebelar se localizan dos tipos de fibras aferentes de características excitatorias con ramas colaterales a los núcleos del cerebelo: Las fibras musgosas, cuyas terminaciones realizan sinapsis en lo glomérulos de las células granulares, y las fibras trepadoras que realizan sinapsis con las neuronas de Purkinje. Las fibras trepadoras reciben este nombre por dar la apariencia de escalar o trepar sobre el árbol dendrítico de las neuronas de Purkinje realizando contactos sinápticos. Todas estas fibras provienen del núcleo olivar, y, al igual que las fibras musgosas, realizan señales excitatorias colaterales a los núcleos del cerebelo (Beitz JA 2010). Por la localización de estas fibras, se le atribuyen funciones reguladoras y coordinadoras de acciones motoras, y su principal

función es dar continuidad, suavidad y armonía al movimiento (Thach *et al.* 1992; Ghez *et al.* 2000).

I.5.NEUROGLIA

El encéfalo está compuesto por neuronas, que constituyen cerca de 100 billones, y por una cantidad aun mayor de células que se conocen como neuroglía. Las células gliales están presentes en una proporción de 10-50 veces más que las neuronas. Estas células no tienen función de transmisión de impulsos, sino que realizan otras funciones más específicas entre las que destacan las de alimentación, sostén y protección.

Algunas de las principales diferencias entre las células gliales y las neuronas son que éstas últimas pueden generar potenciales de acción, mientras que las células gliales tienen un potencial de acción en reposo. Las neuronas tienen sinapsis químicas, mientras que las células gliales no. Las neuronas no tienen capacidad de regeneración, mientras que las células gliales la tienen, aunque limitada. Sin ellas, las neuronas no podrían realizar sus funciones correctamente. En base a su morfología y estructura, se conocen dos tipos de neuroglía, la microglía y la astrogía (Graeber *et al.* 2010). En función de su localización se consideran dos grupos principales de células gliales: la glía central, localizada en el SNC (encéfalo y médula espinal), y la glía periférica, localizada en el sistema nervioso periférico (SNP).

Este trabajo, teniendo en cuenta las características de los distintos tipos celulares gliales, así como las de las enfermedades estudiadas (Scrapie y ECJ), se ha centrado en el papel que desempeñan la astrogía y la microglía.

I.5.1. Astroglía

Representa la población de células gliales más abundante del encéfalo, formando parte de más del 50% del total en la corteza cerebral (Perez-Capote *et al.* 2006). Ramón y Cajal las describió como “células estrelladas con un soma circunscrito al núcleo del cual se proyectan unas prolongaciones” (Perez-Capote *et al.* 2006). Formada por células denominadas astrocitos, están involucrados en la neurotransmisión y el metabolismo, proporcionando soporte físico y nutricional a las neuronas. Se han identificado dos tipos distintos de astrocitos: fibrosos y protoplásmicos.

Se acepta que los primeros aparecen fundamentalmente en la sustancia blanca, y se caracterizan por tener ramificaciones largas, cilíndricas y lisas (Perez-Capote *et al.* 2006); mientras que los segundos se encuentran principalmente en la sustancia gris, dispersos entre los cuerpos neuronales, constituyendo así una gran proporción del volumen de la sustancia gris.

Posee un núcleo pálido de gran tamaño, gránulos de glucógeno y abundantes filamentos gliales (gliofilamentos). Algunas de estas prolongaciones están en contacto con los vasos sanguíneos formando los podocitos (también llamados procesos pediculares o pies perivasculares) y también pueden rodear las sinapsis nerviosas al estar implicados en éstas (sinapsis “tripartita”).

Cuentan con extensiones cuyas terminaciones se encuentran íntimamente adheridas a las paredes de los capilares del SNC formando parte de la barrera hematoencefálica. A causa de esta estrecha relación, se cree que los astrocitos desempeñan un papel en el transporte de sustancias entre los vasos sanguíneos y las neuronas.

También tienen un papel esencial en el metabolismo neuronal. Entre otras funciones absorben neurotransmisores que puedan encontrarse en exceso alrededor de las neuronas, protegiendo así estas células nerviosas de recibir un exceso de estimulación.

En las enfermedades neurodegenerativas se produce un cambio en la red de astrocitos adyacentes al lugar de la lesión pudiendo participar en los procesos de regeneración de lesiones del SNC, aumentando su tamaño y enviando sus proyecciones para rellenar la zona dañada, o también del propio proceso de degeneración. En este sentido, algunos autores proponen incluso que los cambios en los astrocitos como consecuencia del daño neuronal pueden agravar las patologías (Rolls *et al.* 2009). Mientras, otros sugieren que este cambio en los astrocitos sólo trata de evitar el avance de la lesión (Graeber *et al.* 2010).Microglia

Constituyen las células fagocíticas del SNC, como parte del sistema fagocítico mononuclear presente en el encéfalo. En caso de daño neurológico, la microglía se activa y fagocita parte de los restos celulares procedentes de neuronas dañadas. En condiciones normales las células de la microglía presentan un estado denominado en reposo, mostrando un cuerpo celular pequeño de 5 a 10 μm (Streit *et al.* 1998) de donde surgen numerosas ramificaciones muy finas y pequeñas de aspecto espinoso. Esta morfología a su vez varía ligeramente según el sitio de localización (Lawson *et al.* 1992). Así la microglía perivascular, rodea vasos sanguíneos, presentando una morfología redondeada con pequeños brazos gruesos y con espinas; en la sustancia blanca, muestra ramificaciones longitudinales alineadas paralelamente a los

tractos de las fibras nerviosas; y por último las denominadas microglías perineuronales, localizadas en el neuropilo y cerca de las neuronas evidencian una morfología ramificada de forma radial (Lawson *et al.* 1992).

La microglía se localiza en todas las áreas encefálicas, pero no tiene una distribución homogénea, sino que es más abundante en la sustancia gris que en la sustancia blanca (Lawson *et al.* 1992). Representa entre el 5 y el 15% del total de las células del encéfalo (Streit 1996), aunque las cifras pueden variar dependiendo de la especie de que se trate (Peters *et al.* 1991).

Una característica esencial de la microglía es su capacidad para el movimiento ameboideo. Poseen la capacidad de almacenar lípidos, hierro, pigmentos y otras sustancias en forma granular. Estas características se ponen especialmente de manifiesto en cualquier proceso de daño encefálico, constituyendo la denominada microglia activada. Ésta presenta una morfología en relación con la zona donde se encuentra; si la zona contiene axones, la microglía modifica su morfología adoptando un aspecto alargado y estrecho, y si está localizada en la capa granular o en la sustancia blanca, la microglía presenta formas similares a las astrocíticas.

Por lo tanto, este cambio morfológico hacia la forma ameboide se presenta en la fase fagocítica, es decir, cuando actúa como macrófago. Dado que las células de la microglía son las representantes del sistema fagocítico mononuclear en el SNC, pueden actuar como células presentadoras de antígeno, por lo que presentan antígenos de histocompatibilidad del tipo II. Si bien pueden permanecer en estado quiescente durante largos periodos de

tiempo, pueden modificar su comportamiento en respuesta a diversas señales provenientes del entorno celular (Ejarque-Ortiz *et al.* 2007).

La transformación desde un estado inactivo hasta macrófagos fagocíticos, está estrictamente controlada por la producción de varios productos de secreción y a su vez, por medio de éstos, la microglía activada se comunica con otras células del SNC y del sistema inmunológico. De este modo, las células de la microglía representan una defensa esencial del huésped, además de un sistema de reparación, por lo que también pueden llegar a ser responsables de la destrucción de tejidos y de la muerte neuronal, según cuál sea el balance entre las señales activadoras e inhibitorias (Graeber *et al.* 2010).

I.5.2. Gliosis

La neuroglía es fundamental durante el proceso neurodegenerativo. En general, la gliosis se considera una respuesta a la presencia de neuronas dañadas. Sin embargo, esto no implica que en el caso de las EET constituya una respuesta al daño neuronal producida por la acumulación de PrPsc, pero si se ha demostrado que la gliosis coincide con los depósitos de PrPsc, por lo que dichos depósitos podrían estimular la gliosis (Forloni *et al.* 1994;(Brown *et al.* 1996).

También existen estudios que demuestran que la gliosis se produce antes de la neurodegeneración (Jendroska *et al.* 1991; DeArmond *et al.* 1992; Giese *et al.* 1998), por lo que el carácter perjudicial de la gliosis sugerido anteriormente, no puede descartarse.

En las primeras etapas de las enfermedades neurodegenerativas la astrogliosis sufre la activación de los astrocitos (astrocitos reactiva) consistente en

el aumento del número y del tamaño de estas células gliales (Zlotnik 1986; Beach et al. 1989; Delacourte 1990), es decir un proceso de hipertrofia e hiperplasia. Estos cambios pueden afectar la conectividad sináptica, pudiendo ser así responsables de los primeros déficits cognitivos y reducir su potencial neuroprotector, con lo que aumenta la vulnerabilidad de las neuronas a diferentes tipos de agresiones neurotóxicas.

En las etapas posteriores, el proceso neurodegenerativo desencadena la astrogliosis y la activación de la microglía, lo que también contribuye al desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas (Rodríguez *et al.* 2011).

La reacción de los astrocitos sugiere un papel importante para estas células como sensores de sutiles cambios de la homeostasis del encéfalo. Tienen una relación directa con la síntesis de glutamato, que es el principal neurotransmisor excitatorio del encéfalo (Cotman *et al.* 1987). Están íntimamente relacionados con el metabolismo de este aminoácido, que participa en la recaptación de aminoácidos en las hendiduras sinápticas. Si esta comunicación fracasa, las consecuencias fisiológicas pueden provocar daño neuronal. La síntesis del glutamato neuronal se realiza por dos vías: como un derivado del metabolismo de la glucosa a través del α -cetoglutarato, o a partir de la glutamina que han recaptado de las células gliales (Fonnum 1993). La glutamina liberada por los astrocitos mediante la vía de la glutamina sintetasa (Norenberg *et al.* 1979), es liberada por las células gliales y la vuelven a captar las neuronas. Esta glutamina sintetasa está localizada en las prolongaciones citoplasmáticas de los astrocitos rodeando las sinapsis (Derouche *et al.* 1991). A esta estrecha interacción entre

astrocitos y neuronas se le conoce como vía glutamina-glutamato (Balazs *et al.* 1990; Martinez 2000).

Por otra parte, los astrocitos responden activamente a las lesiones del encéfalo, inicialmente rodean la extensión del daño, reparan la barrera hematoencefálica y los circuitos neuronales dañados (Kalman *et al.* 1989; Landty *et al.* 1990; Mucke *et al.* 1993). Cambian su forma y aumentan en cantidad al producirse la lesión (Fedoroff *et al.* 1986; Yoshida *et al.* 1991), son productores de péptidos y factores tróficos que participan en el crecimiento y vida neuronal (Norton *et al.* 1992) y realizan importantes funciones en el tejido cerebral dañado, participando en los procesos de regeneración, aumentando su tamaño y enviando sus proyecciones para rellenar la zona dañada (Fedoroff *et al.* 1986; Lindsay 1986). Al activarse expresan moléculas que normalmente no son detectadas en la astrogía en reposo, incrementando los factores de crecimiento. Además cuando están activos forman una barrera física entre el área dañada y el resto de tejido nervioso impidiendo el crecimiento axonal (Eddleston *et al.* 1993);(Garrido *et al.* 2009). Por esta razón, su participación se considera que en ocasiones puede llegar a convertirse en perjudicial en vez de protectora (Halliwell 1992; Woodroffe *et al.* 1993). Anteriormente se creía que los astrocitos no participaban en la transmisión debido a que no se excitan eléctricamente. Sin embargo, en la actualidad son considerados células excitatorias, ya que al ser activados liberan mensajes a las células cercanas mediante el fenómeno denominado gliotransmisión (Volterra *et al.* 2005);(Ejarque-Ortiz *et al.* 2007). Puesto que los astrocitos rodean las sinapsis neuronales del SNC, los gliotransmisores como el glutamato (Haydon 2001; Nedergaard *et al.* 2003) y el

ATP permiten a los astrocitos ejercer control sobre la actividad neuronal (Newman 2003).

En el caso concreto de las enfermedades priónicas, la astrogliosis constituye una de las características de este grupo de enfermedades. Esto indica que los cambios en el SNC, como la mayoría de los cambios neurodegenerativos, están acompañados por la proliferación de los astrocitos.

Existen indicios de que la gliosis se produce antes de la neurodegeneración (Jendroska *et al.* 1991; DeArmond *et al.* 1992; Giese *et al.* 1998). Esta proliferación de las células gliales puede ocurrir ya sea como respuesta a la presencia de PrPsc o como respuesta al daño a las neuronas. Sin embargo, los sitios donde se observa la astrogliosis, coinciden con los patrones de distribución de acumulación de la PrPsc (DeArmond *et al.* 1987). La hipertrofia, además de los cambios histológicos y metabólicos, son respuestas características de los astrocitos y la neurodegeneración inducida por la PrPsc (Eng *et al.* 1987; Malhotra *et al.* 1990; Hafiz *et al.* 2000).

La consecuencia inmediata de la gliosis reactiva es la formación de la cicatriz glial (Fawcett *et al.* 1999); (McGraw *et al.* 2001). Aunque otros tipos de células contribuyen en su formación, la cicatriz glial se compone principalmente de astrocitos que han migrado de regiones dístales al sitio de la lesión o son generados por las células madre neurales. El propósito de la cicatriz no se entiende bien, pero se cree que participan en el mantenimiento de la homeostasis mediante el aislamiento de la región dañada y por lo tanto, la protección del tejido (Anderson *et al.* 2002).

La microglía es extremadamente sensible a cualquier alteración del microambiente en el SNC, como desequilibrios iónicos y estrés (Kreutzberg 1996; Sugama *et al.* 2007; Ransohoff *et al.* 2009). Estas células se activan en cualquier estado patológico, reflejándose en alteraciones morfológicas y bioquímicas en su estructura (Streit *et al.* 1999; Ransohoff *et al.* 2009). La activación implica un cambio notable en su morfología que pasa de ser ramificada a una forma intermedia y ameboide con morfología similar a la de los fagocitos (Morioka *et al.* 1993);(Lehrmann *et al.* 1997; Thored *et al.* 2009).

Las señales de activación de la microglía en caso de daño en el tejido no están del todo claras. Sin embargo, hay evidencia experimental que sugiere que la liberación de los nucleótidos de purina, incluyendo ATP, ADP o UTP por las neuronas lesionadas, actúan como un mecanismo importante por el cual la microglía se activa como respuesta a la lesión tisular (Davalos *et al.* 2005; Nimmerjahn *et al.* 2005). Estos nucleótidos parecen actuar sobre los receptores P2Y de la microglía y a su vez, de los astrocitos como respuesta quimiotáctica de la microglía. Además, se conoce que los canales de conexión de los astrocitos continuamente liberan nucleótidos de purina, lo que resulta ser fundamental para dirigir los procesos de la microglía al lugar de la lesión (Davalos *et al.* 2005; Nimmerjahn *et al.* 2005);(Gomes-Leal 2012).

A diferencia del resto de los macrófagos, la microglía expresa niveles de CD45 y del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II). Además, muestra capacidad endocítica y fagocítica, debido a las señales que recibe de las neuronas y los astrocitos. La activación de la microglía responde a una serie de señales activadoras procedentes del SNC, al mismo tiempo que puede ser

activada por la ausencia de estos mismos estímulos o señales. En concreto se trata de componentes intracelulares que activan proteínas secretadas por las mismas neuronas, las proteínas activadoras gliales, como las quimioquinas o neurotransmisores, como el glutamato (Biber *et al.* 2007).

También existen señales inhibitoras ocasionadas por lesiones que pueden desencadenar la activación microglial, procedentes de contactos intercelulares neurona-glía dañados o que han interrumpido su neurotransmisión (Hanisch *et al.* 2007);(Mott *et al.* 2004). O también factores solubles liberados por las neuronas como los neurotransmisores o neuropéptidos, entre las que se pueden mencionar las citoquinas que son liberadas por las células gliales en respuesta a un estímulo (John *et al.* 2003).

La microglía también sintetiza el factor de crecimiento nervioso, o factor neurotrófico (Elkabes *et al.* 1996), además de proteínas de membrana, receptores de complemento 3, MHC II, citoquinas y enzimas. La microglía en estado de reposo expresa bajos niveles de receptores de crecimiento y no expresa receptores de manosa (Aloisi *et al.* 2000).

Dado que el reconocimiento de patógenos incrementa la capacidad fagocítica de los anticuerpos, la microglía activada induce la función de los linfocitos T, la síntesis de MHC II y de moléculas co-estimuladoras para la presentación de antígeno (Aloisi *et al.* 2000; Aloisi 2001; Ejarque-Ortiz *et al.* 2007).

Existen evidencias de que durante el desarrollo de patologías crónicas neurodegenerativas la microglía activada mantiene una respuesta local ante la

ausencia de neutrófilos como protección del SNC. Sin embargo, también se postula un papel potencialmente perjudicial para este tipo celular (Streit 2002).

Por lo tanto, la microglía activa parece iniciar la respuesta encefálica inmune, innata y adaptativa, mientras que los astrocitos parecen ser los responsables de su regulación y de su desactivación (Haller *et al.* 1998).

En relación con las EET, se asume que la replicación de la proteína prión depende de la expresión de la PrPc en las células huésped (Bueler *et al.* 1993) y los tipos celulares que la expresan son, por tanto, candidatos para su replicación. Los astrocitos, y posiblemente también las células de la microglía, acumulan PrPsc en fases tempranas de la enfermedad (Diedrich *et al.* 1991; Moser *et al.* 1995). Esta observación parece sugerir la implicación de estas células en la patogenia de las EET (Kretzschmar *et al.* 1986; Manson *et al.* 1992; Harris *et al.* 1993).

La PrPc se expresa principalmente en las neuronas, sin embargo existen otros tipos de células que también expresan PrPc. En la microglía y los astrocitos el nivel de expresión de la PrPc es considerablemente menor, ya que sólo expresan una sola forma (doble glicosilada) mientras que las neuronas expresan tres formas (doble, individual y no glicosilada) (Brown *et al.* 1998); (Brown 1999); (Brown *et al.* 2004) (Fig. 6).

La microglía parece desempeñar también un papel en la dispersión y la replicación de la PrPsc. En el Scrapie y ECJ, su activación es paralela al patrón temporal y espacial de los depósitos de PrPsc y precede a la pérdida de neuronas y a la manifestación de signos clínicos de la enfermedad (Manuelidis *et al.* 1997; Williams *et al.* 1997; Hughes *et al.* 2002; Andreóletti *et al.* 2002a). Se

ha propuesto que, dependiendo del agente causal, la activación microglial precede o sucede a la acumulación de la PrPsc (Baker *et al.* 1999).

Las neuronas y los astrocitos parecen responder a la entrada de la PrPsc mediante la atracción de la microglía a través del receptor de fractalquina y al receptor de quimiocina 5 (Hughes *et al.* 2002; Marella *et al.* 2004; Lee *et al.* 2005), activando células gliales en el encéfalo de pacientes enfermos de ECJ, y animales afectados de Scrapie, que expresan citoquinas como la interleucina tipo 1 (IL-1), el complemento C1q y la catepsina S (Dandoy-Dron *et al.* 1998; Baker *et al.* 2003).

También se ha demostrado la migración de la microglía rápida y eficazmente en el encéfalo de animales afectados con Scrapie antes de la aparición de los síntomas clínicos y coincidente con la regulación de la elevación de citoquinas (Priller *et al.* 2006).

Por otro lado, se ha observado la presencia de PrPsc en la microglía, aunque se desconoce si es debido a la fagocitosis de neuropilo o a la producción intrínseca de la isoforma específica de la enfermedad dentro de la microglía. Algunos autores han llegado a la conclusión de que la formación de las fibras de placa amiloide se produce dentro de estas células, y que éstas regularían la distribución de estas placas en la corteza cerebral, hipocampo y tálamo en animales afectados con Scrapie (Williams *et al.* 1994). La activación microglial también se ha descrito en el bulbo raquídeo, en la cápsula interna y en la sustancia blanca del cerebelo (William *et al.* 1995) pero parece que la sustancia gris del cerebelo es la principal diana de la activación microglial en el caso de la ECJ. En animales infectados con Scrapie, la activación se observa de forma

similar en las áreas de vacuolización, depósitos de PrPsc y en la apoptosis neuronal (Sasaki *et al.* 1993; Rezaie *et al.* 2001).

Dada la importancia de la neuroglía en el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas y el desarrollo de lesiones características, este trabajo de investigación sugiere la participación directa de las células gliales, astrocitos y microglía, en la patogenia de las EET animales y humanas.

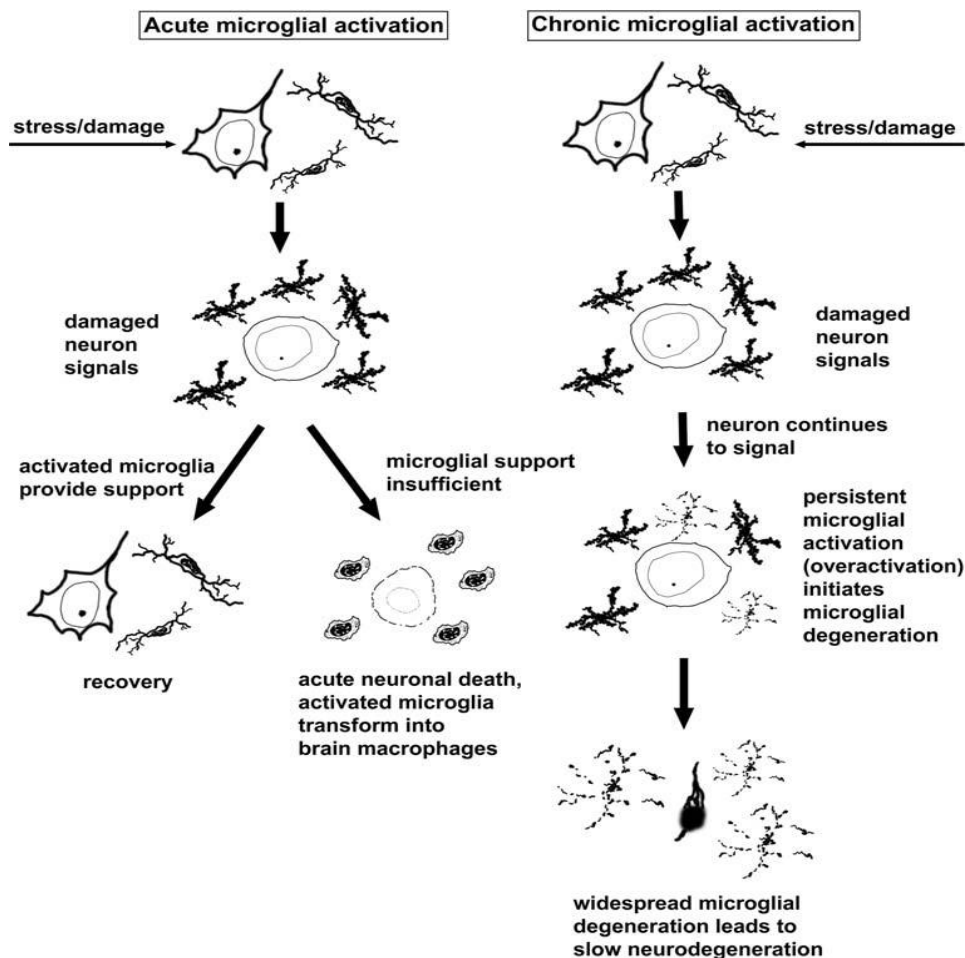


Fig. 2 Una visión actualizada de la plasticidad funcional de la microglía implica interacciones neuronales durante la activación microglial aguda y crónica. El disparador inicial para la activación de la microglía son señales emitidas por las neuronas dañadas o el estrés. Este aumento de las actividades microgliales, se refleja en la hipertrofia celular, representa una reacción neuroinflamatoria aguda que está diseñada para llevar a cabo la recuperación de la tensión neuronal o lesión. La muerte neuronal aguda dará lugar a la formación de los macrófagos del encéfalo: la microglía (Graeber *et al.* 2010)

I.6. TÉCNICAS

Las técnicas de diagnóstico de las EET están basadas en la observación de lesiones histopatológicas características y en la detección de la proteína prión patológica (PrPsc) en el SNC (OIE 2008), puesto que al carecer la PrPsc de material genético y ante la inexistencia de respuesta inflamatoria, no es posible aplicar técnicas de biología molecular o serológicas. Además, el diagnóstico de laboratorio se ve dificultado debido a que la distribución de la proteína en el organismo no es homogénea, localizándose principalmente en el SNC, y en muy bajas concentraciones en denominados tejidos y fluidos corporales (Kubler *et al.* 2003).

Por lo tanto, el diagnóstico inicial de las EET se basa en la observación de lesiones características en el SNC, como la espongirosis, muerte neuronal y gliosis, evidenciables mediante la visualización por microscopía óptica tras una tinción con la técnica de hematoxilina-eosina (Wells *et al.* 1995).

Por otra parte, para la detección de la PrPsc, el otro criterio diagnóstico de estas enfermedades, una de las técnicas más utilizadas es la inmunohistoquímica (IHQ), lo que permite determinar su presencia y distribución en el tejido, además de su localización y las características del depósito (Gonzalez *et al.* 2003). Esta técnica permite el diagnóstico de la enfermedad antes de que se observen las lesiones histopatológicas características en el SNC (Miller *et al.* 1993; Foster *et al.* 1996; Jeffrey *et al.* 1998; Wells *et al.* 1998; Begara-McGorum *et al.* 2000; Ryder *et al.* 2001). La especificidad y sensibilidad de la IHQ depende de los anticuerpos y la metodología utilizada (Haritani *et al.* 1994; Bell *et al.* 1997; Hardt *et al.* 2000).

El microscopio confocal emplea una técnica de óptica de imagen que elimina la luz procedente de las zonas fuera de foco, incrementando el contraste al utilizar un “*pinhole*” espacial para eliminar la luz fuera de foco o destellos de la lente. Por otro lado, la introducción de la técnica confocal presenta grandes ventajas frente a la microscopía óptica convencional especialmente, mayor resolución y contraste, debido a que variando el plano de enfoque el sistema es capaz de tomar imágenes a diferente profundidad lo que permite obtener información tridimensional de la muestra (Wilson 1990). Pueden obtenerse imágenes, que pueden digitalizarse y aplicarles técnicas de análisis de imagen para mejorar su calidad, para comparar cambios en el tiempo, medir intensidades o tomar medidas morfométricas. Finalmente a partir de las secciones ópticas es posible aplicar técnicas de reconstrucción 3D que permiten observar las estructuras (Sheppard 1993).

MATERIAL Y METODOS

IV. MATERIAL Y METODOS

El trabajo en el modelo de Scrapie se ha realizado sobre secciones sagitales de muestras obtenidas de cerebelo de ovino, proporcionadas por el banco de tejidos del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de Zaragoza. En todas ellas se incluyó una región representativa de la capa molecular, la capa de las células de Purkinje y la capa granular, incluyendo también una zona de sustancia blanca. Los animales sometidos a estudio procedían de diversas áreas de la Comunidad Autónoma de Aragón con el objeto de aumentar la variabilidad fenotípica de los casos.

Los animales que se seleccionaron se encontraban en un rango de entre 1 año y 9 años de edad, con el fin de ampliar también la variabilidad de la edad. Se consideró oportuno mantener la homogeneidad sexual utilizando sólo hembras para el estudio.

Se incluyeron animales que se encontraban en diferentes estadios de la enfermedad en función de sus manifestaciones clínicas. Concretamente, 6 animales en fase pre-clínica, 8 en fase clínica y 8 en fase terminal. También se utilizaron 6 animales pertenecientes a rebaños donde nunca se había descrito ningún caso de Scrapie como controles negativos.

El genotipo fue otra de las variables que se tuvo en cuenta a la hora de seleccionar los animales, de manera que se trató de incluir en el estudio el mayor número posible de genotipos diferentes. 3 de los controles negativos presentaban genotipos ARQ/ARQ y otros 3 ARR/ARQ. De los animales positivos en fase pre-clínica, 6 ovinos poseían el genotipo ARQ/ARQ; de los correspondientes al estadio clínico 6 presentaron genotipo ARQ/ARQ y 2

MATERIALY METODOS

genotipo ARQ/VRQ; y en los animales en fase terminal, 6 poseían genotipo ARQ/ARQ, 1 genotipo ARQ/VRQ y otro genotipo VRQ/VRQ (Tabla 7).

Tabla 5. Relación de muestras animales diagnosticadas de Scrapie natural y controles negativos sanos en función de los diferentes variables estudiadas (edad, genotipo, procedencia y estadio clínico)

ID OVEJA	PROCEDENCIA	EDAD	GENOTIPO	FASE CLINICA
0-97	AGUARÓN/ZARAGOZA	7 años 6 meses	ARQ/ARQ	CONTROL
0-184	AGUARÓN/ZARAGOZA	6 años 5 meses	ARR/ARQ	CONTROL
0-512	EPILA/ZARAGOZA	5 años 3 meses	ARQ/ARQ	CONTROL
0-576	VILLAMAYOR/ZARAGOZA	3 años	ARQ/ARQ	CONTROL
0-600	TAUSTE/ZARAGOZA	4 años 3 meses	ARR/ARQ	CONTROL
0-762	VILLAMAYOR/ZARAGOZA	2 años 6 meses	ARR/ARQ	CONTROL
0-580	VILLAMAYOR	3años 8 meses	ARQ/ARQ	PRE-CLINICAS
0-868	VILLAMAYOR	2años 1 mes	ARQ/ARQ	PRE-CLINICAS
0-895	HUESCA/SOTONERA	4años 6 meses	ARQ/ARQ	PRE-CLINICAS
0-931	VILLAMAYOR	1año 4 meses	ARQ/ARQ	PRE-CLINICAS
0-976	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	2años 6 meses	ARQ/ARQ	PRE-CLINICAS
0-1074	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	8años 3 meses	ARQ/ARQ	PRE-CLINICAS
0-329	VILLAMAYOR	3años 3 meses	ARQ/ARQ	CLINICAS
0-792	VILLAR DE LOS NAVARROS	6años 5meses	ARQ/ARQ	CLINICAS
0-862	HERRERA DE LOS NAVARROS	5años 1 mes	ARQ/ARQ	CLINICAS
0-864	HERRERA DE LOS NAVARROS	7años 9 meses	ARQ/ARQ	CLINICAS
0-894	HUESCA/SOTONERA	3años 9 meses	ARQ/ARQ	CLINICAS
0-978	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	7años	ARQ/VRQ	CLINICAS
0-983	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	3años 8 meses	ARQ/VRQ	CLINICAS
0-1145	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	7años 9 meses	ARQ/ARQ	CLINICAS
0-389	VILLAMAYOR/ZARAGOZA	5años 2 meses	ARQ/ARQ	TERMINALES
0-783	VILLAR DE LOS	9años	ARQ/ARQ	TERMINALES

MATERIALY METODOS

0-787	NAVARROS VILLAR DE LOS NAVARROS	4años 5 meses	ARQ/ARQ	TERMINALES
0-919	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	3años 9 meses	VRQ/VRQ	TERMINALES
0-977	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	3años 5 meses	ARQ/VRQ	TERMINALES
0-979	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	2años 6 meses	ARQ/ARQ	TERMINALES
0-986	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	2años 3 meses	ARQ/ARQ	TERMINALES
0-990	TERUEL/TORRE LOS NEGROS	3 años 5 meses	ARQ/ARQ	TERMINALES

El estudio los casos de ECJ se realizaron también sobre muestras de tejido cerebelar, que habían sido diagnosticados como ECJ esporádico (ECJe) ó ECJ familiar (ECJf), fueron cedidas por el Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid. Uno de los centros de referencia de autopsias de casos de EETs humanas. Del total de las muestras estudiadas, 21 eran mujeres, con un rango de edad comprendido entre los 54 y los 82 años, y 9 varones, con edad entre 48 hasta los 79 años (Tabla 8).

Tabla 6. Relación de las muestras humanas diagnosticadas de ECJ y de las usadas como controles negativos en función de los datos aportados por el Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid.

No. Identificación	Sexo	Edad	Forma
BBC 3HC	M	66	ECJe
BBC 5HC	M	76	ECJe
BBC 7HC	V	79	ECJe
BBC 9HC	M	64	ECJe
BBC 12HC	M	55	ECJf
BBC 13HC	V	63	ECJe
BBC 17HC	V	69	ECJe
BBC 30HC	V	73	ECJe
BBC 37HC	M	69	ECJe
BBC 38HC	M	75	ECJe
BBC 41HC	V	73	ECJe
BBC 44HC	M	82	ECJe
BBC 45HC	M	62	ECJe

MATERIALY METODOS

BBC 47HC	V	48	ECJe
BBC 50HC	M	76	ECJe
BBC 54HC	M	76	ECJe
BBC 58HC	M	59	ECJe
BBC 61HC	M	54	ECJf
BBC 71HC	M	67	ECJf
BBC 72HC	M	59	ECJe
BBC 74HC	M	65	ECJe
BBC 75HC	M	61	ECJe
BBC 76HC	M	58	ECJe
BBC 77HC	M	79	ECJe
BBC 78HC	M	71	ECJe
BBC 81HC	V	73	ECJe
BBC 85HC	M	68	ECJe
BBC 92HC	M	78	ECJe
BBC 94HC	V	79	ECJe
BBC 95HC	V	72	ECJe
CONTROLES			
BBC 51VC	M	42	Isquemia
BBC 52VC	V	45	Isquemia
BBC 53VC	M	62	Isquemia
BBC 79VC	V	36	Isquemia
BBC 108VC	V	82	Isquemia

Las muestras humanas que se utilizaron como controles negativos en este estudio fueron procedentes de 2 mujeres y 3 varones, entre los 36 y los 82 años de edad que fueron diagnosticadas todos ellos por isquemia cerebral.

La metodología empleada para determinar la participación de la neuroglía (astroglía y microglía), además de la localización de la PrPsc, así como de las lesiones neurodegenerativas en tejido cerebelar ovino y humano, consistió en la aplicación de técnicas histológicas e inmunohistoquímicas para la valoración mediante microscopía óptica y/o confocal.

En concreto, en ambos modelos se realizaron técnicas de tinción con hematoxilina-eosina e inmunohistoquímica para la detección de PrPsc, astroglía y microglía, para valorar mediante microscopía óptica convencional, así como de

inmunofluorescencia por doble marcaje para valoración por microscopía confocal.

IV.1. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

En el caso de las muestras de origen animal, una vez realizada la extracción del encéfalo completo, se llevó a cabo su tallado mediante la realización de cortes transversales de 3 cm de grosor que fueron sumergidos para su fijación durante 48 horas en formaldehído al 10%. Seleccionando la sección correspondiente al cerebelo descrito anteriormente, se realizaron cortes de 5mm de grosor que nuevamente se sumergieron en formaldehído durante 24 horas para su completa fijación. Posteriormente, las muestras fueron incluidas en parafina mediante un procesador de tejidos (TP0150, Leica) siguiendo el siguiente protocolo: durante 10 minutos a temperatura ambiente, se realizó inmersión en formaldehído y posteriormente durante 5 minutos a 40°C se efectuó otra inmersión en etanol al 70%. Durante 15 minutos manteniendo la misma temperatura que la inmersión anterior, se realizó inmersión en etanol al 90%, y luego al 100% durante 45 minutos. Finalmente, una última inmersión en xilol durante 55 minutos a 43°C y la inclusión en parafina durante 15 minutos a 58°C.

En el caso de las muestras de origen humano, procedentes, como ya se ha indicado, del Banco de Tejidos del Hospital de Alcorcón, se encontraban sumergidas en formol al 10%. Posteriormente se sometieron a inmersión en ácido fórmico al 98% para inactivación de la PrPsc, y se realizó el mismo protocolo de inclusión en parafina descrito para las muestras de origen animal.

IV.2. TINCION HEMATOXILINA-EOSINA

Todas las muestras estudiadas humanas y animales, fueron procesadas histológicamente siguiendo el protocolo de rutina establecido en el Centro de Investigación de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes.

Concretamente, se realizó un desparafinado en solución de xilol durante 10 minutos (x2), seguido por la hidratación en alcoholes de graduación decreciente efectuando inmersiones de 5 minutos en cada fase a 100°, 100°, 96° y 60°. Finalmente, se tiñeron con hematoxilina durante 15 minutos, y con eosina durante 13 minutos. Después se realizó la deshidratación en alcoholes crecientes a 60°, 90°, 100°, 100° durante 5 minutos en cada uno para finalizar con inmersión en xilol, previamente al montaje con DPX.

IV.3. INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETECCION DE LA PrPsc

Para la detección de la PrPsc se siguió un protocolo similar al descrito por Monleón *et al.*, (2003), al que es necesario adicionar un protocolo de desenmascaramiento de epítomos realizando un pretratamiento con ácido fórmico durante 15 minutos, la digestión con proteinasa K durante 15 minutos a 37°C, y tratamiento térmico a 80°C durante 5min.

Posteriormente, se llevó a cabo el bloqueo de la peroxidasa endógena (H₂O₂ 33%) durante 5 minutos, antes de la incubación con el anticuerpo primario que reconoce de forma específica la PrPsc, L42 (1:500, *R-Biopharm*, Darmstadt, Alemania) durante 30 minutos RT. Se incubó con el polímero marcado *Envisión*TM (*Mouse* DAKO, Dinamarca) y se reveló con *DAB PLUS* (DAKO), durante 10 minutos. Se tiñó con hematoxilina durante 20 segundos, y

se llevó a cabo el proceso de deshidratación en alcoholes crecientes (concentraciones de alcohol a 70°, 96°, 100°, 100°) realizando 3 inmersiones continuas durante 5 minutos y una final en xilol, previamente al montaje con DPX.

IV.4. INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA DETECCIÓN DE GFAP

A partir de las muestras humanas y animales incluidas en parafina, al igual que para la detección de PrPsc, se realizaron cortes de 5µm de grosor y se transfirieron a portaobjetos tratados con Vectabond, llevando a cabo el procedimiento de secado en estufa durante toda la noche a 56°C antes de iniciar el protocolo de inmunohistoquímica.

El desparafinado se realizó mediante inmersiones en xilol durante de 5 minutos (x2), posterior inmersión en etanol 99% durante 5 minutos (x2), pasando a la siguiente inmersión en etanol 96% por espacio de 3 minutos, en etanol 70% durante 1 minuto y finalmente etanol al 50% durante 1 minuto.

A continuación se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena (H₂O₂ 33%) para reducir las señales inespecíficas durante 5 minutos RT. Posteriormente, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo primario *Rabbit Anti-Cow GFAP* (DAKO, 1:250), que reconoce una proteína específica de los filamentos intermedios de los astrocitos, durante 30 minutos RT. Se continuó con la incubación con el polímero marcado *EnVision™* (Rabbit (DAKO) de nuevo, durante 30 minutos RT. Se efectuó el revelado con *AEC* (DAKO,) durante 10 minutos RT y finalmente, se realizó una tinción con hematoxilina durante 40 segundos y el montaje en solución acuosa (*Faramount, aqueous mounting medium*, DAKO).

IV.5. INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETECCION DE MICROGLIA

Se realizaron también cortes de 5µm de grosor a partir de las muestras ovinas incluidas en parafina y se transfirieron a portaobjetos tratados con Vectabond, que se mantuvieron en estufa durante toda la noche a 56°C. El desparafinado se realizó mediante inmersiones en xilol durante 3 minutos (x2), posterior inmersión en etanol 99% durante 3 minutos (x2), inmersión en etanol 96% durante 1 minuto, etanol 70% durante 1 minuto y finalmente, etanol al 50% durante otro minuto.

También se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena (H₂O₂ 33%) para reducir las señales inespecíficas durante 5 minutos RT. Posteriormente, se llevó a cabo la incubación con una combinación de anticuerpos primarios que reconocen de forma específica la microglía activa (Oswald *et al.* 2005): IB4 (1:500, Invitrogen, Oregón, Estados Unidos) y MHCII (1:200, DAKO) durante 72 h 4°C. A continuación, la incubación con el polímero marcado *En Vision™* (Mouse (DAKO), durante 30 minutos RT. Para el revelado se utilizó *DAB PLUS* (DAKO) durante 10 minutos RT. Finalmente, se realizó una tinción con hematoxilina durante 20 segundos y se realizó el montaje en solución acuosa (*Faramount, aqueous mounting medium* DAKO).

El protocolo usado para la detección de la microglía en muestras humanas, fue el mismo que se acaba de describir para las muestras ovinas, pero utilizando como anticuerpos primarios MHCII (1:200, DAKO) y CD68 (1:500, DAKO), sólo durante 30 minutos RT.

IV.6. INMUNOHISTOQUIMICA PARA LA VISUALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

A partir de las muestras de cerebelo humanas y animales, siguiendo el protocolo descrito por Sarasa *et al.* (2012), se realizaron secciones de 50µm utilizando el vibratomo (*Microm HM650v Walldorf, Alemania*) que fueron recogidos en PBS (flotación). Se efectuó el bloqueo de la peroxidasa endógena (H₂O₂ 33%) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Al término de este primer pre-tratamiento, se realizó incubación con PBS-Tritón x100 (0.1 % en PBS), durante 3 h RT para lograr que la membrana aumentara su permeabilidad. A continuación, se llevó a cabo el mismo protocolo de desenmascarado de epítomos que el utilizado en el protocolo de inmunohistoquímica para detectar la PrP^{sc}. Es decir realizando un pretratamiento con ácido fórmico durante 15 minutos, la digestión con proteinasa K durante 15 minutos a 37°C, y tratamiento térmico a 80°C durante 5 minutos.

Se continuó con la primera incubación utilizando los anticuerpos específicos frente a GFAP (1:500 DAKO) y microglía IB4 (1:500, Invitrogen) y MHCII (1:200, DAKO) diluidos en PBS-Tritón (x100) durante 72 h a 4°C en agitación. En el caso de las muestras humanas la incubación con los anticuerpos primarios fue sólo durante 24 h, sustituyendo el IB4 por el CD68 y manteniendo constantes el resto de las condiciones.

Una vez concluida la incubación se adicionaron los anticuerpos secundarios: Alexa 488 (1:200, Invitrogen, Oregón, EEUU) y Alexa 594 (1:200, Invitrogen Oregón, EEUU) durante 1 h en oscuridad RT. Finalmente, se realizó el montaje en PBS-glicerina, para su posterior valoración con el microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging, Alemania). La emisión de

fluorescencia resultaba de la excitación con los láseres de 488nm y 594nm; se toman imágenes seriadas en un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss MicroImaging, Alemania) con objetivos de 10x (NA 0.3) y 20x (NA 0.5).

Como controles de la técnica se incluyeron además muestras de tejido cerebelar ovino correspondiente a animales diagnosticados como una meningoencefalitis, frecuentemente por listerias. Adicionalmente, se aplicó el mismo protocolo sobre muestras procedentes del Banco de Tejidos del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de Zaragoza, y pertenecientes a cada animal con el objeto de utilizarlas como controles individuales asegurando el inmunomarcaje de las células de la línea monocítica.

IV.7.PROCEDIMIENTO PARA VISUALIZACION MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRONICA

A partir de muestras fijadas en formaldehído, se realizó un lavado durante 5-7 días en tampón fosfato 0,4 M previamente a su fijación en 2,5% de glutaraldehído durante 6 h. Durante ese tiempo se realizaron cambios del glutaraldehído cada 2 horas. Se trató con tetróxido de osmio 0,05% en tampón fosfato durante 2 h en agitación.

Posteriormente, se realizó la deshidratación en acetona a diferentes concentraciones crecientes (30%, 60%, 90% 100%, 100%; durante 30 minutos cada una). A continuación, se realizó una inmersión en 0,5 ml de acetona durante 15 minutos antes de añadir la araldita (Durcupan, Fluka AG, Suiza) durante 15 minutos. Posteriormente, se renovó esta resina durante 15 minutos adicionales. Tras el lavado se incluyeron en la resina (a 70°C durante 24 horas).

MATERIALY METODOS

Se realizaron cortes al microtomo semifinos de 0.5 μm antes de realizar los cortes ultrafinos (0,95 μm) utilizando cloroformo para ser recogidos en rejillas de cobre (*Carbon-formvar 200-mesh grids*, Ted Pella, Inc. EEUU) que se tiñeron con acetato de uranilo durante 45 minutos a 37°C. Tras realizar lavados en agua destilada, se tiñeron en citrato de plomo (10 min, RT) y se realizó la observación al microscopio electrónico (FEI Tecnai G2 Spirit, 60.000KV).

RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1. SCRAPIE

I.6.1. Análisis histopatológico (H/E)

El análisis histológico (H/E) mostró que los seis animales control no presentaron cambios histopatológicos en ninguna de las capas estudiadas (Fig. 9-a). Sin embargo, dependiendo de la etapa clínica en que se encontraban los animales afectados de Scrapie se observaron diferentes lesiones. La vacuolización principalmente (espongiosis), daño neuronal (distrofia y atrofia de las células de Purkinje) y pérdida neuronal (evidenciada por un claro aumento de la distancia entre las células de Purkinje) fueron las alteraciones patológicas más frecuentes en todos estos animales.

Las observaciones morfológicas en aquellos animales que se encontraban en la etapa pre-clínica de la enfermedad eran aparentemente similares a los descritos en los controles sanos, pero con una lesión temprana próxima a las células de Purkinje, manifestándose en forma de vacuolización perineuronal (Fig. 9-b).

En la etapa clínica, las vacuolas continuaron observándose de forma perineuronal alrededor de las células de Purkinje, pero también aparecían en el interior del soma de estas neuronas. La pérdida neuronal comenzó a hacerse evidente también en esta capa. Además, se observó vacuolización dispersa en otras capas cerebelosas (Fig. 9-c).

RESULTADOS

En la fase terminal, una intensa vacuolización estuvo presente en todas las capas, pero especialmente en la capa de células de Purkinje, evidenciando vacuolas perineuronales e intraneuronales (Fig. 9-d).

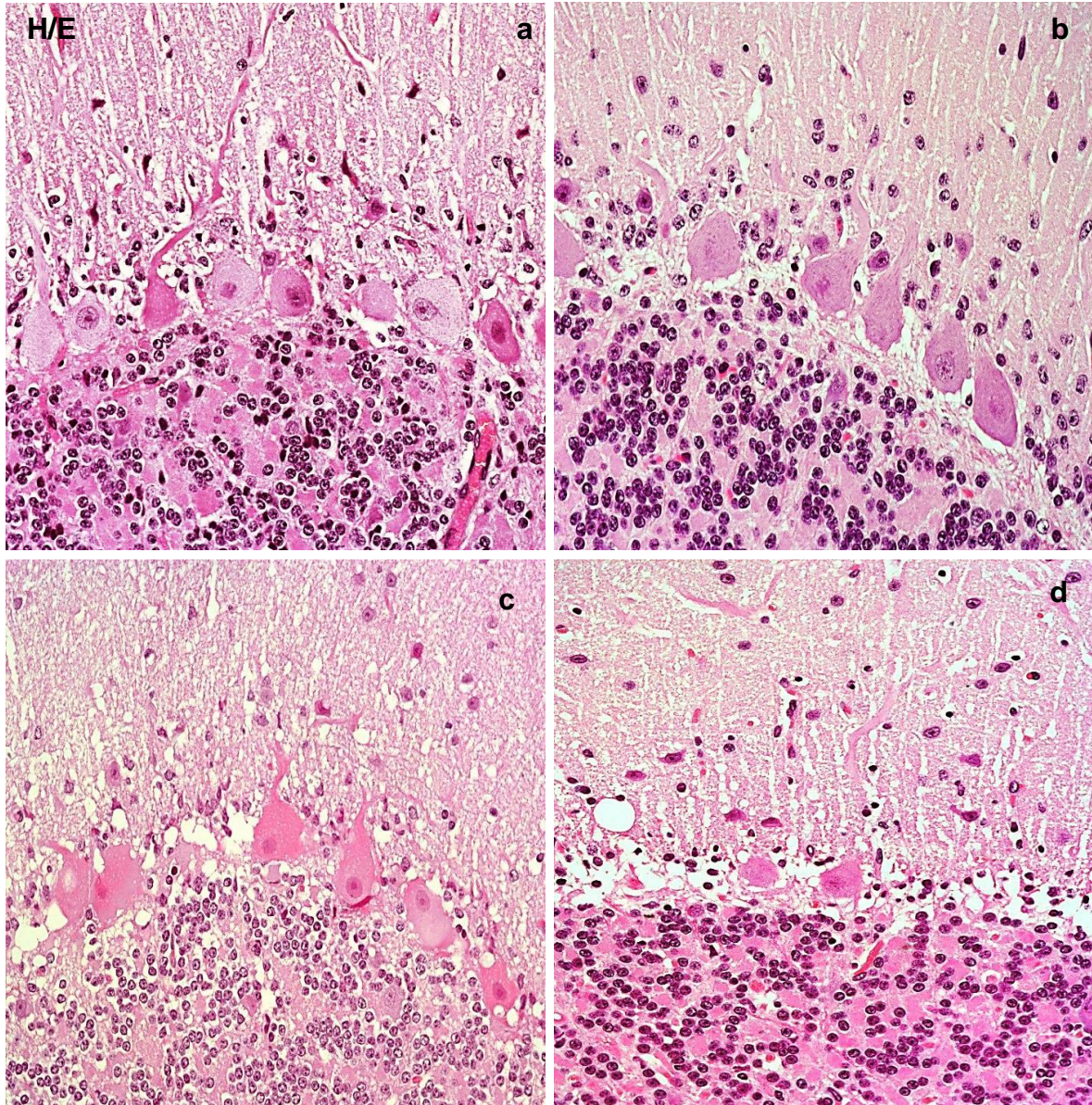


Fig. 3 Hallazgos histopatológicos observados mediante tinción con hematoxilina/eosina en cerebelos procedentes de animales control (a), pre-clínicos (b), clínicos (c) y terminales de Scrapie (d; 400x).

RESULTADOS

El cambio morfológico más destacado se observó también en relación con estas células, donde existía un evidente engrosamiento de sus neuritas en un gran número de animales en este estadio final de la enfermedad siempre localizadas en la capa molecular (Fig. 10).

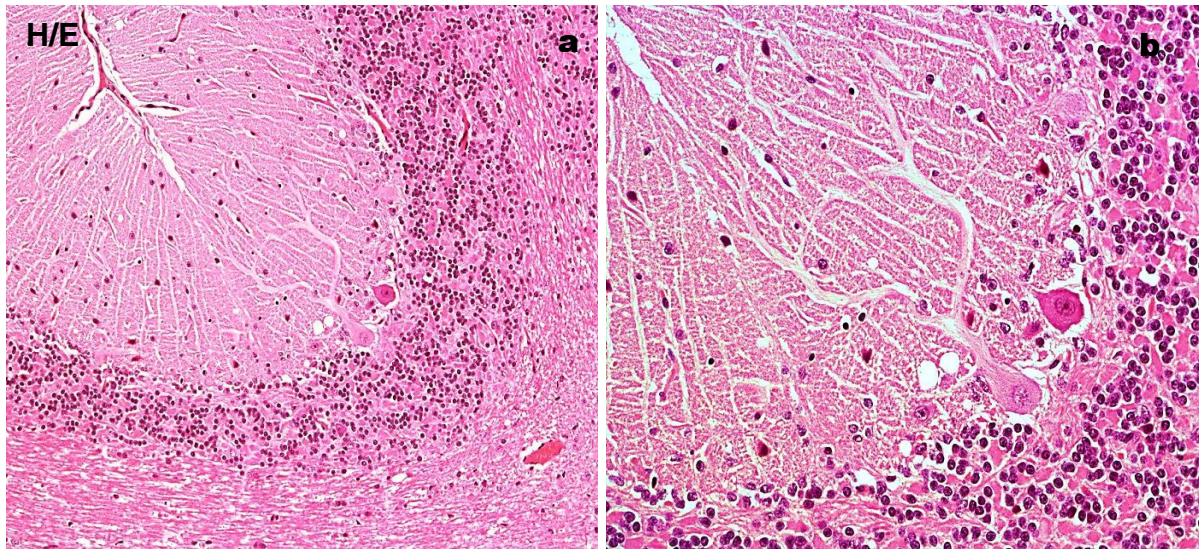


Fig. 4 Hallazgos histopatológicos observados mediante tinción con hematoxilina/eosina en cerebelos procedentes de animales en fase terminal (a) 50x (b) 200X.

I.6.2. Detección de PrPsc

En ninguna de las muestras procedentes de los animales control se detectaron depósitos de PrPsc. Por el contrario, en todas las muestras correspondientes a casos de Scrapie se detectó dicha proteína, siguiendo un patrón generalizado de distribución y morfología en relación con los astrocitos muy similar dentro de cada etapa de la enfermedad (Fig. 11-a).

En los animales estudiados de etapa pre-clínica de la enfermedad el patrón de distribución de la PrPsc coalescente y difuso se observó principalmente en las capas granular y molecular. En esta última capa, también se observaron depósitos de forma estrellada, y en la capa de células de Purkinje, los depósitos de PrPsc mostraron principalmente un patrón perineuronal (Fig.11-b).

La observación más destacada en cuanto a la detección de la PrPsc en las muestras de animales en etapa clínica consistió en un aumento evidente de la inmunotinción en todas las áreas estudiadas, pero sobre todo en la zona de la capa granular más próxima a las células de Purkinje, donde los depósitos perineuronales eran mucho más abundantes que en la etapa pre-clínica de los animales. Otro hallazgo que debe ser mencionado es con respecto a la capa molecular, donde la inmunotinción mostró un patrón estrellado en una proporción muy alta de los casos estudiados (Fig.11-c).

En la etapa final de la enfermedad, los depósitos de PrPsc se acumulaban prioritariamente, aunque no exclusivamente, en la capa granular y sustancia blanca, y muy en particular alrededor de la capa de células de Purkinje. Sin embargo, la acumulación de PrPsc disminuyó drásticamente en la capa molecular de todas las ovejas afectadas de la enfermedad en la fase terminal. Se considera relevante señalar también una indiscutible reducción de la acumulación de PrPsc en la sustancia blanca de los animales en fase terminal con respecto a las etapas anteriores de Scrapie (Fig.11-d).

RESULTADOS

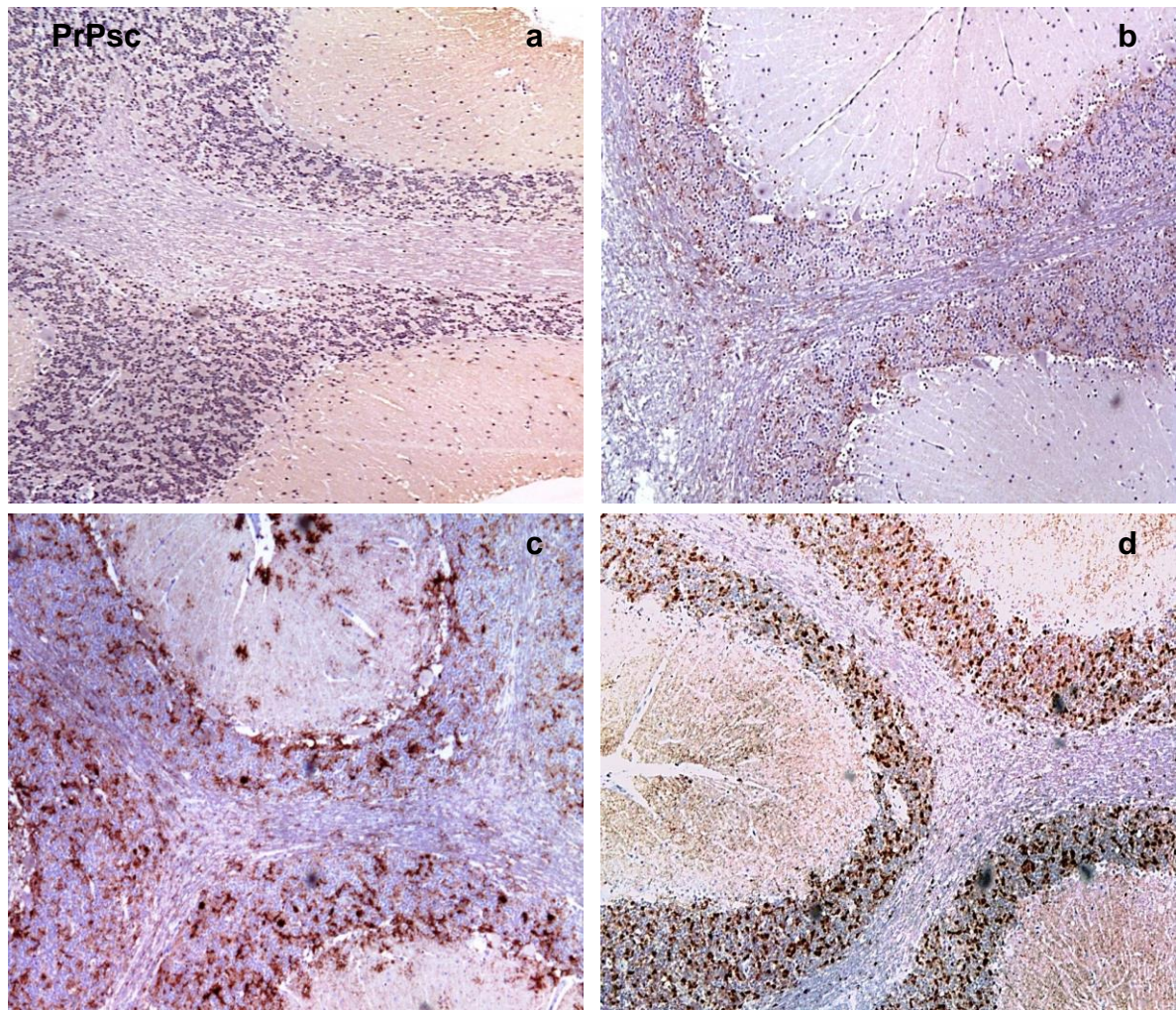


Fig. 5 Inmunohistoquímica frente a PrPsc en el cerebelo de muestras control (a), pre-clínicas (b), clínicas (c) y terminales de Scrapie (d; 50x).

Con el fin de profundizar en las distintas alteraciones que afectan a las células de Purkinje, como uno de los hallazgos más destacados en el presente estudio, se utilizó la microscopía electrónica para el estudio ultraestructural de algunas de las muestras. Las micrografías electrónicas obtenidas en dicho estudio demostraron la implicación de las células gliales en, al menos, algunas de las alteraciones histopatológicas observadas en este tipo celular, ya que precisamente las imágenes donde se encontró vacuolización perineuronal mostraron la presencia de células gliales alrededor del tipo celular estudiadas en todos los casos (Fig.12).

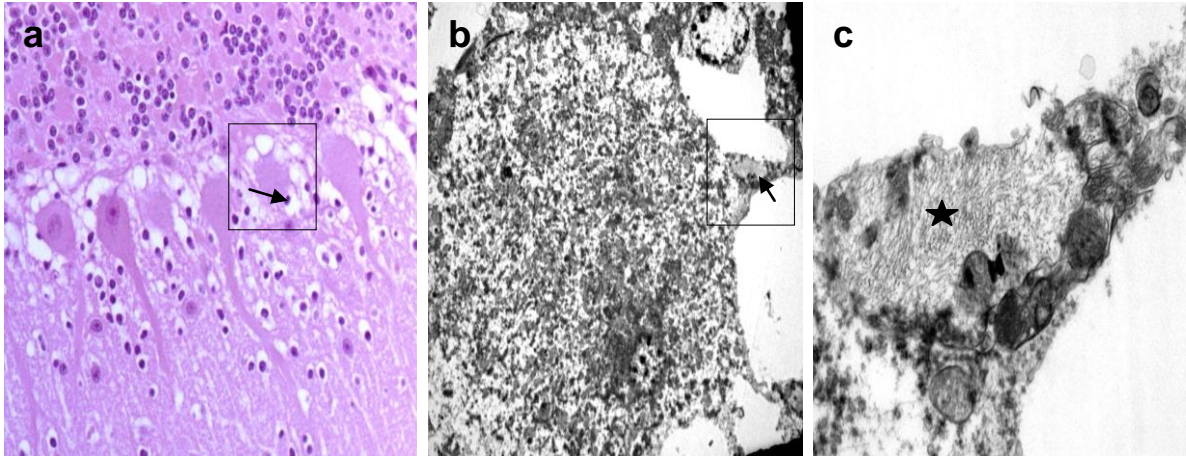


Fig. 6 Vacuolización perineuronal visualizada mediante microscopía óptica (a) y electrónica (b - c) en la capa de células de Purkinje en un caso de Scrapie terminal (400x, 4000x y 30000x, respectivamente).

I.6.3. Detección de GFAP

La inmunotinción con GFAP mostró un patrón de distribución glial similar en todas las ovejas control: los astrocitos se encontraban dispersos en las capas granular y molecular, mostrando una intensa inmunotinción en la sustancia blanca y en la zona perineuronal en torno las células de Purkinje especialmente de forma perineuronal (Fig. 13-a).

En todas las muestras de los animales pre-clínicos se observó un patrón similar de distribución de la GFAP respecto al descrito en los animales control. Sólo existía una diferencia cuantitativa relativa al inmunomarcaje en la zona de la capa granular próxima a las células de Purkinje, así como en la sustancia blanca, donde también aumentó en comparación con los controles. Además, en la capa molecular se observó principalmente un inmunomarcaje con morfología fibrilar, coincidiendo en gran medida con el patrón de la glía de Bergman (Fig. 13-b).

RESULTADOS

En los animales en la fase clínica, el patrón de inmunotinción de la GFAP difería del observado en los animales control y pre-clínicos, principalmente en relación con la morfología y la intensidad de las estructuras GFAP inmunopositivas situadas en la capa molecular, que dejaba de seguir el patrón fibrilar y se convertía predominantemente en estrellado. En la zona de la capa granular próxima a la capa de células de Purkinje, el inmunomarcaje perineuronal aumentaba cuantitativamente en relación con el estadio anterior. Sin embargo, en aquellas zonas donde la pérdida neuronal fue más evidente, la inmunopositividad frente a GFAP disminuyó e incluso, desapareció (Fig. 13-c).

En la etapa terminal, las principales observaciones con respecto a las etapas anteriores en relación con la distribución de GFAP consistieron en un aumento aún mayor de la intensidad de inmunomarcaje en el área de la capa granular más cercana a las células de Purkinje. Estos depósitos parecían conservarse aun con ausencia de neuronas (Fig. 13-d). En la capa molecular, el patrón que siguió el inmunomarcaje con GFAP coincidió de nuevo, como en el estadio pre-clínico, principalmente con la glía de Bergman.

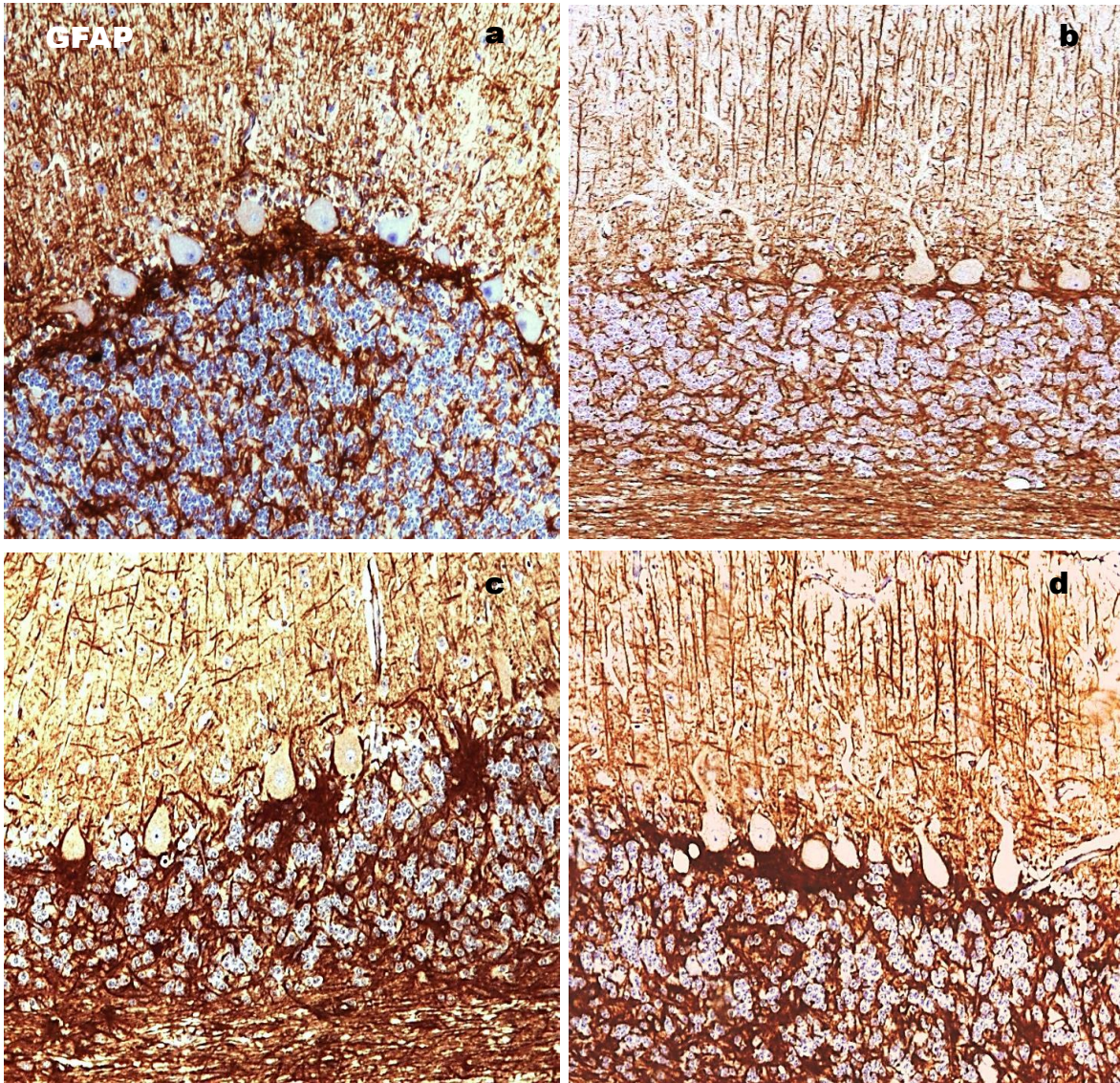


Fig. 7 Hallazgos histopatológicos detectados por inmunohistoquímica frente a GFAP en el cerebelo de muestras control (a), pre-clínicas (b), clínicas (c) y terminales de Scrapie (d; 100x).

En relación con los variables edad, genotipo o rebaño, no se evidenció ninguna diferencia destacable sobre los elementos astrogiales marcados con GFAP.

I.6.4. Detección de microglía reactiva

El inmunomarcaje frente a MHC II e IB4, que según la (Oswald *et al.* 2005) permite detectar la microglía reactiva, pero no en reposo o inactiva, mostró un patrón de distribución similar en los cortes de todos los cerebelos ovinos que se

RESULTADOS

estudiaron, tanto los utilizados como control, como los afectados de Scrapie. Se observó una discreta inmunotinción dispersa a lo largo de la capa molecular, granular y sustancia blanca (Fig.14). Las células de la microglía fueron observadas en relación con vasos sanguíneos en numerosas ocasiones. Las muestras correspondientes a animales en distintas fases de la enfermedad no mostraron cambios evidentes respecto a la morfología, ni a la intensidad, en relación con los animales control.

Sin embargo, en dos de las muestras analizadas procedentes de animales en el estadio clínico, el inmunomarcaje de la microglía reactiva aumentó cuantitativamente en comparación con el resto de muestras, destacando un aparente aumento de dicho marcaje principalmente en la capa molecular (Fig. 14).

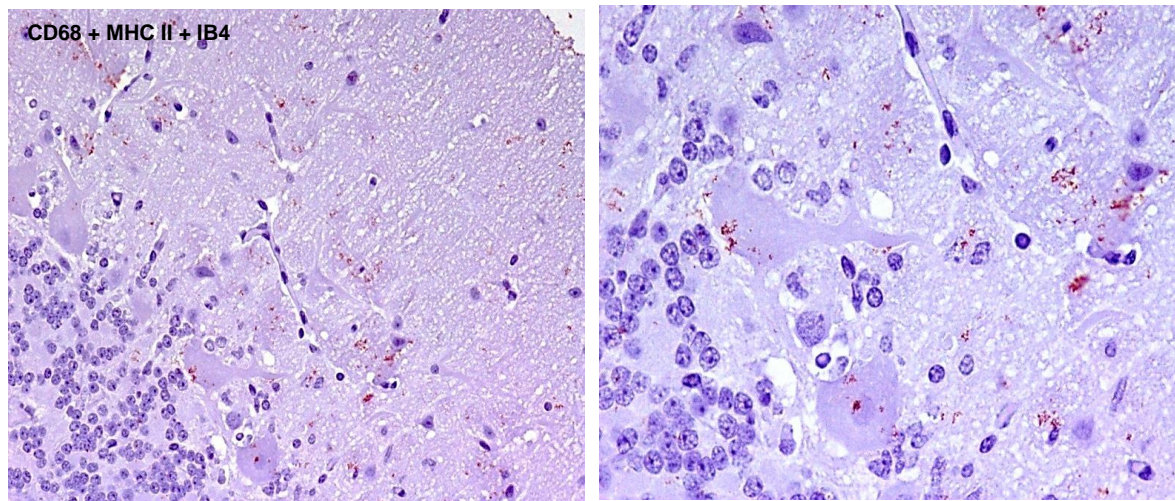


Fig. 8 Inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en el cerebelo de muestras clínicas de Scrapie; 200x y 400x respectivamente.

Del mismo modo, en otras dos de las muestras procedentes de animales en fase terminal se observó un evidente aumento de la señal y en concreto en la sustancia blanca, en la capa molecular y en la zona cercana a las células de Purkinje (Fig.15).

RESULTADOS

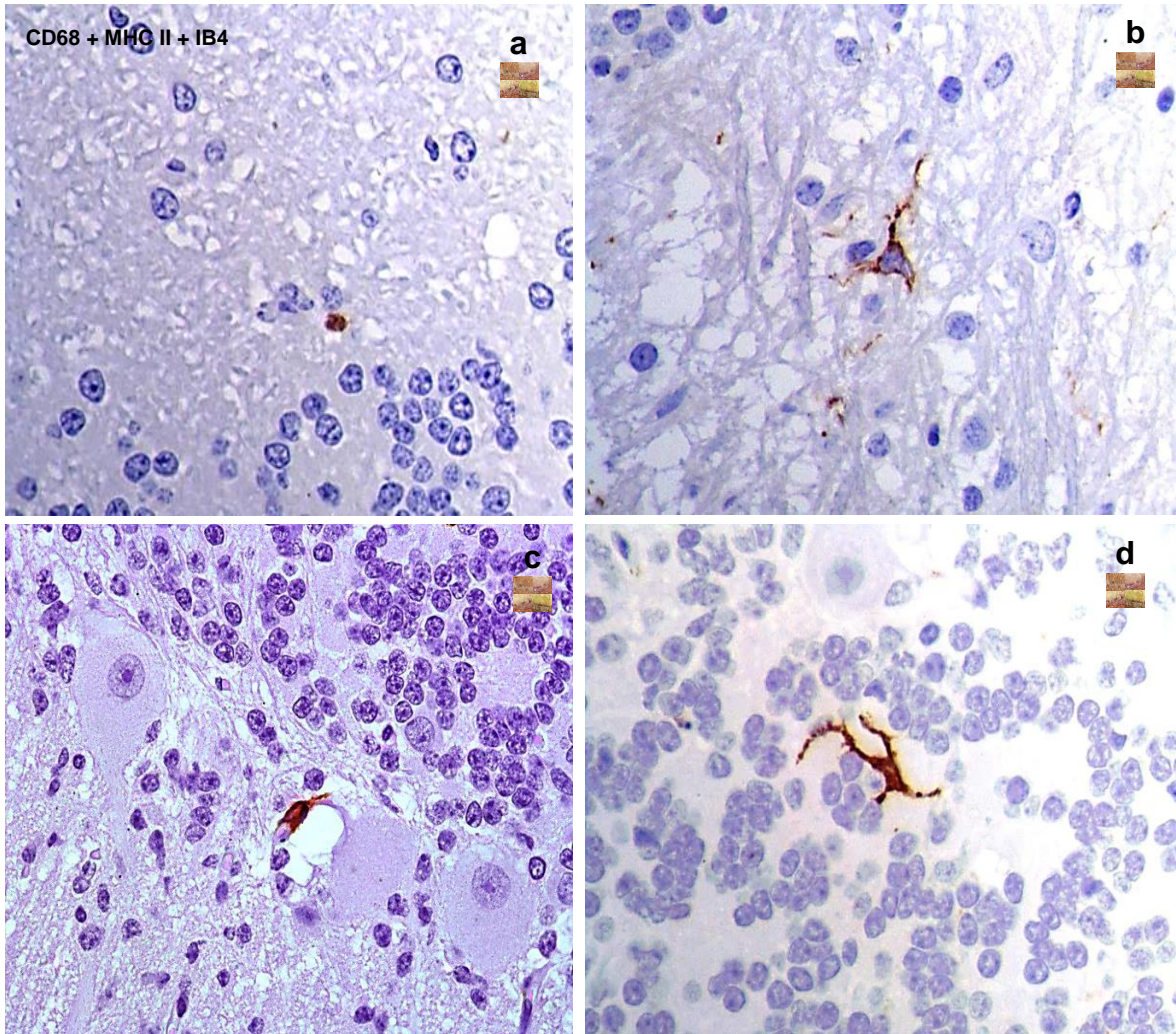


Fig. 9 Inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en el cerebelo de muestras control (a), pre- clínicas (b), clínicas (c) y terminales de Scrapie (d; 400x).

El análisis llevado a cabo en el presente estudio en búsqueda de posibles factores que se encontraran relacionados con el aumento de microglía reactiva descrita en los 4 casos citados, permitió determinar una estrecha relación con los genotipos del animal. En concreto, el análisis sobre la susceptibilidad genética de las ovejas valoradas en este estudio, concluyó que precisamente estos 4 animales donde se detectó un aumento evidente de microglía reactiva presentaban los genotipos ARQ/VRQ y VRQ/VRQ, mientras que el resto de los animales estudiados presentaban genotipo ARQ/ARQ (Fig. 16).

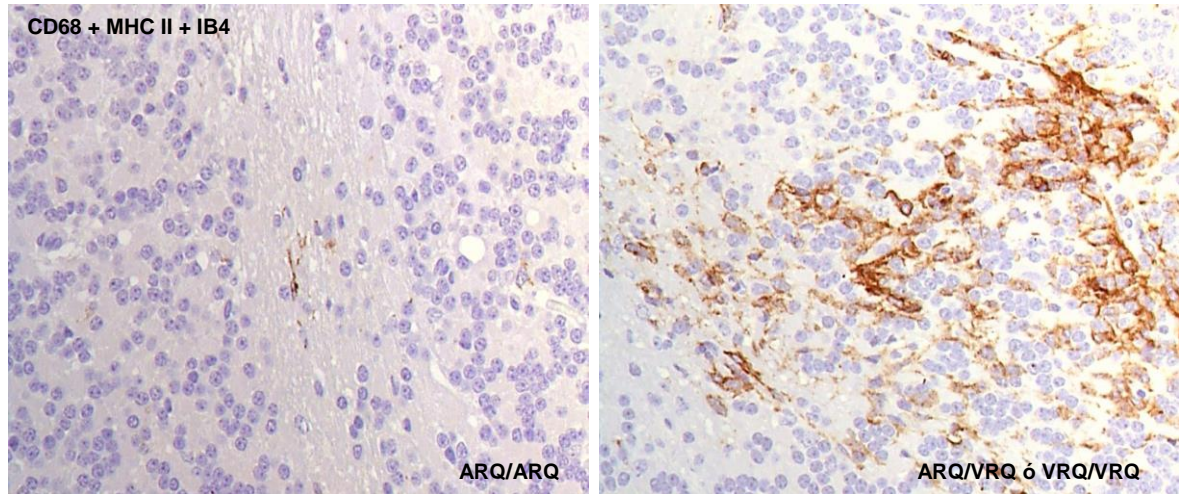


Fig. 10 Diferentes patrones de reactividad de la microglía con relación al genotipo de muestras en fase terminal (200x).

I.6.5. Estudios de doble marcaje (astroglía y microglía reactiva) mediante microscopía confocal

Con el fin de identificar la posible relación entre los astrocitos y las células de la microglía con el desarrollo de la enfermedad o incluso su participación en el transporte de la PrPsc en el tejido nervioso, se utilizó la técnica de microscopía confocal.

El estudio realizado mediante esta técnica para valorar la astroglía y la microglía reactiva, permitió confirmar una evidente relación de la microglía con los vasos sanguíneos y las meninges.

Sin embargo, no fue posible establecer ninguna interacción entre las células de la microglía y los astrocitos durante el desarrollo de la enfermedad en los diferentes estadios clínicos (Fig.17).

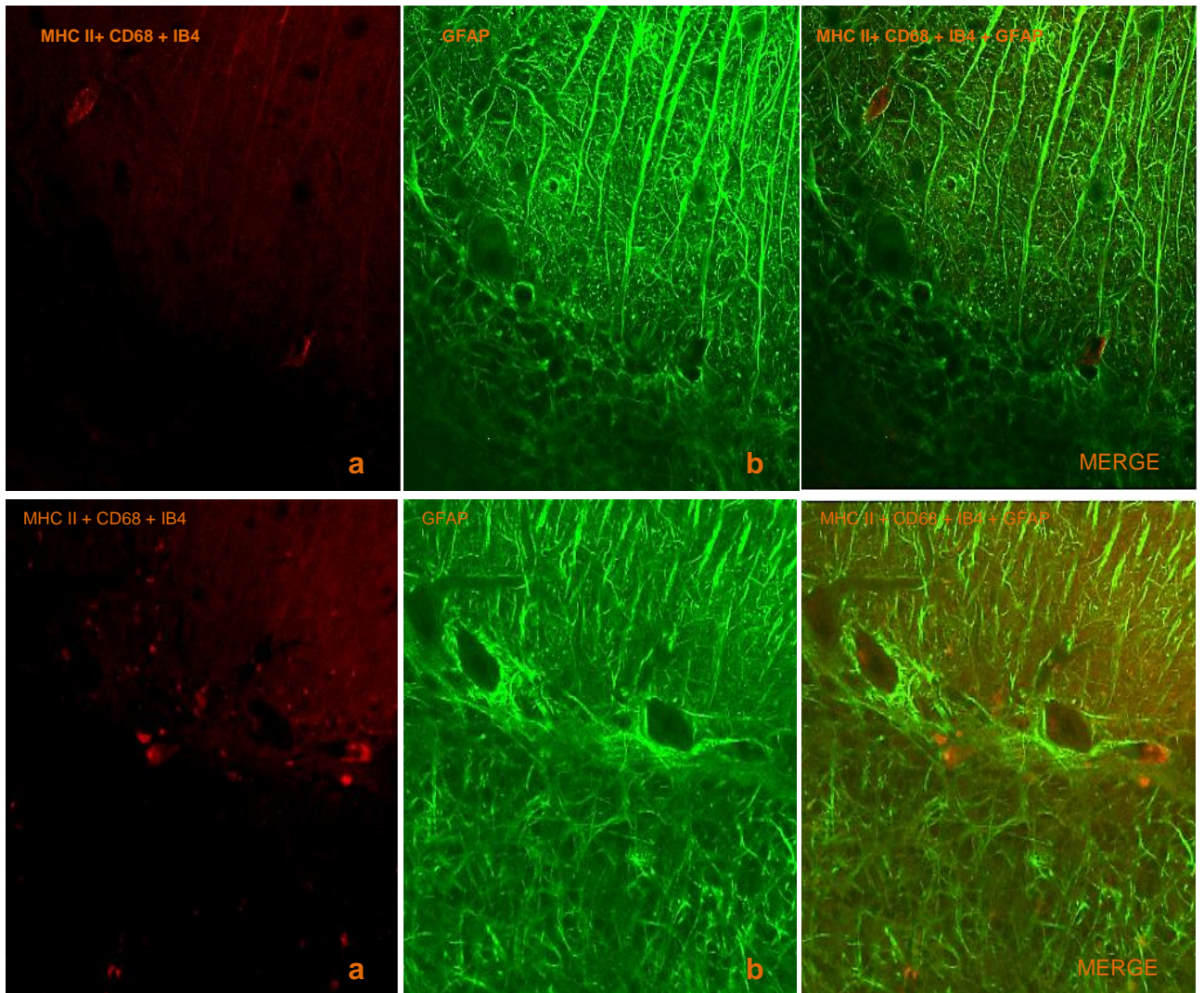


Fig. 11 Co-localización de la microglía reactiva (a) y astroglía (b) en muestras de Scrapie en fase clínica (400x, NA-1,3)

V.2. ENFERMEDAD DE CREUTZFELDT JAKOB

I.6.6. Análisis histopatológico (H/E)

El análisis histológico (H/E) mostró que las cinco muestras humanas diagnosticadas con Isquemia anoxia, que se utilizaron como controles negativos, presentaron algunas alteraciones histopatológicas en el área estudiada. En concreto, se observó pérdida neuronal en la capa de células de Purkinje en todos los casos (Fig. 18).

RESULTADOS

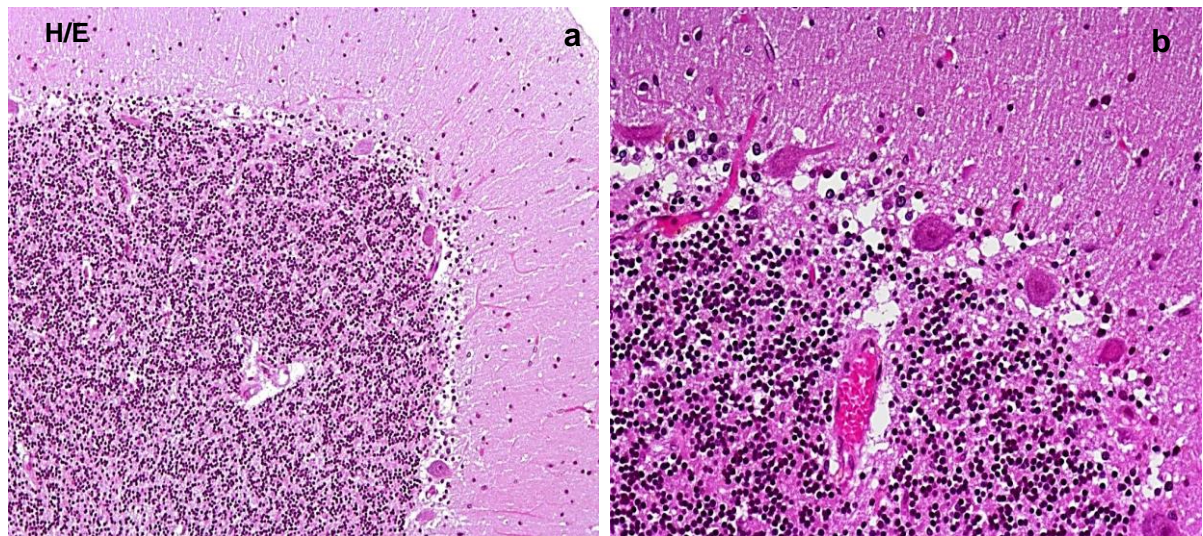


Fig. 12 Hallazgos histopatológicos mediante tinción con H/E en una muestra control humana 50x (a) y 400x (b)

En un caso diagnosticado de isquemia anoxia se observó degeneración exclusivamente de la capa granular, diferenciándose del resto de muestras estudiadas que no presentaron esta misma degeneración (Fig.19).

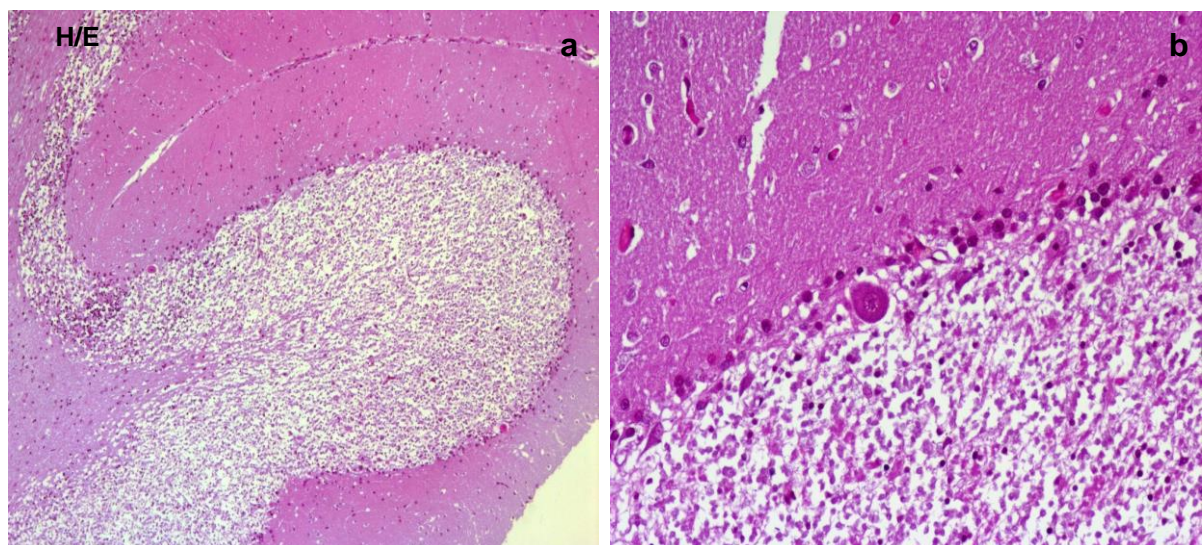


Fig. 13 Degeneración de la capa granular en una de las muestras control acompañada de pérdida neuronal masiva (a) 50x y (b) 400x.

En las muestras procedentes de pacientes de ECJ, se observó también una pérdida neuronal masiva de las células de Purkinje, pero acompañada de vacuolización perineuronal e intraneuronal cuando estas permanecían viables.

RESULTADOS

Además, se evidenció espongiosis moderada o severa de la capa molecular (Fig.20).

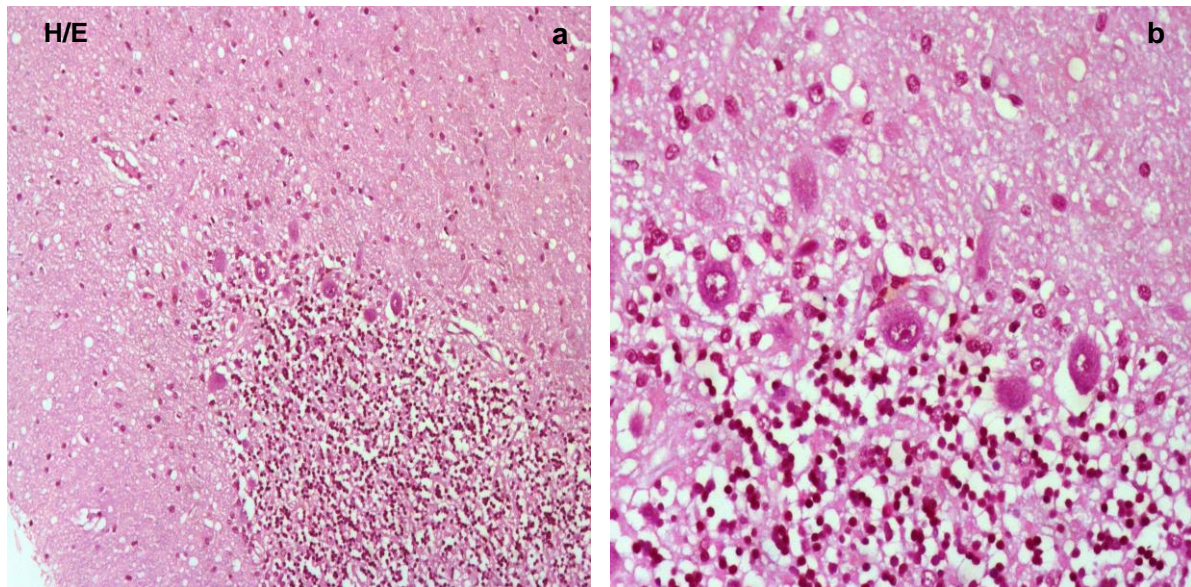


Fig. 14 Vacuolización observada mediante tinción con H/E de una muestra de cerebelo de un enfermo de ECJ (a) 100x y (b) 400x.

La distribución observada con relación al patrón de vacuolización en la muestra estudiada permitió dividir el total de las muestras en dos grupos: el primero, manteniendo una relación con la capa granular preferentemente (Fig. 21-a, b). Y el segundo grupo, mostrando la vacuolización principalmente en la capa molecular (Fig. 21- c, d).

RESULTADOS

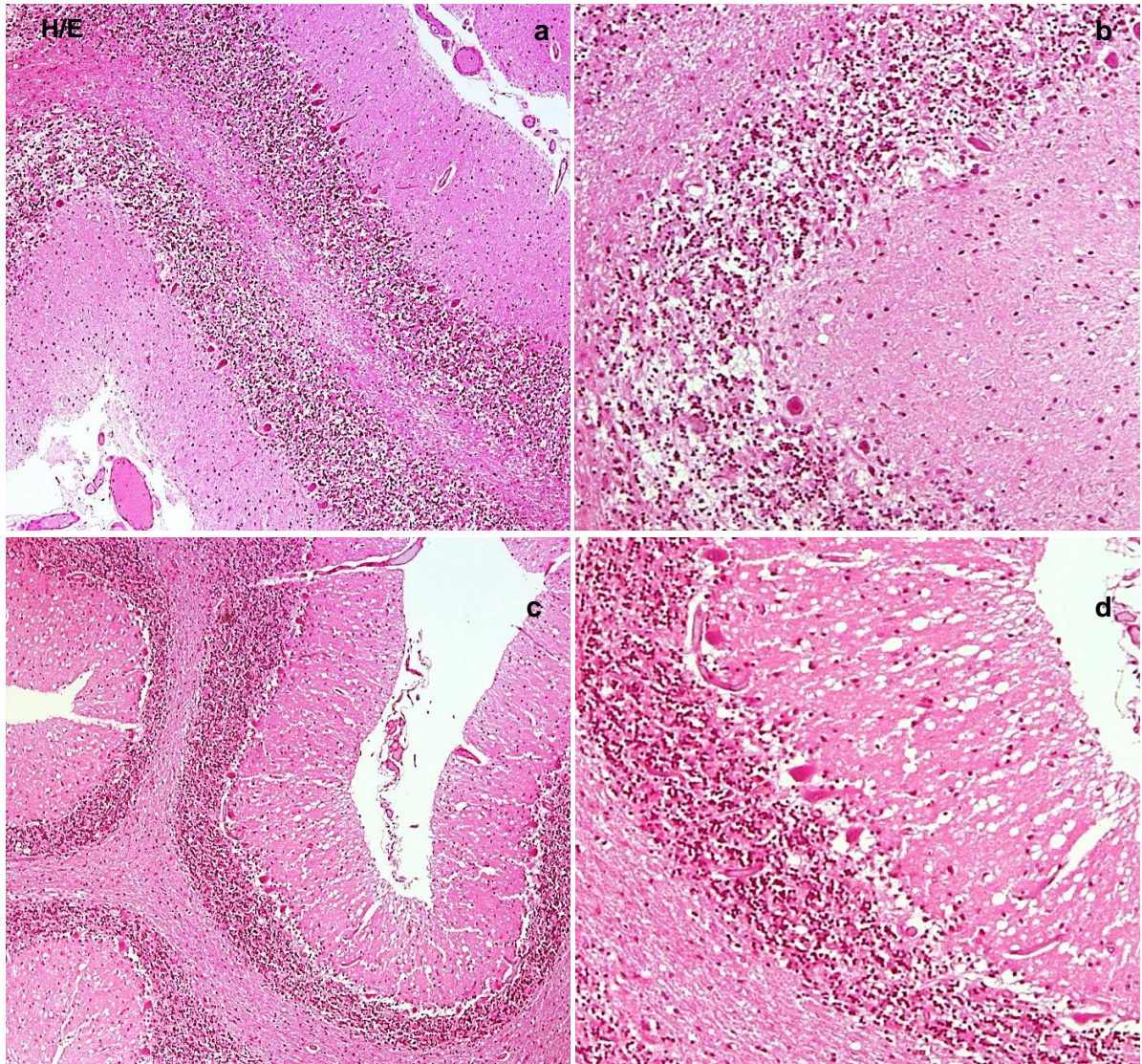


Fig. 15 Patrones de distribución de la vacuolización visualizada mediante tinción H/E en muestras de cerebelo procedentes de pacientes de ECJ. Principalmente afectando a capa granular (50x, a); 200x (b) y a capa molecular (50x, c); 200x (d).

Cabe mencionar que de forma adicional en algunas muestras se observó degeneración de la capa granular, ocasionada por una disminución del número de células granulares (Fig.22).

RESULTADOS

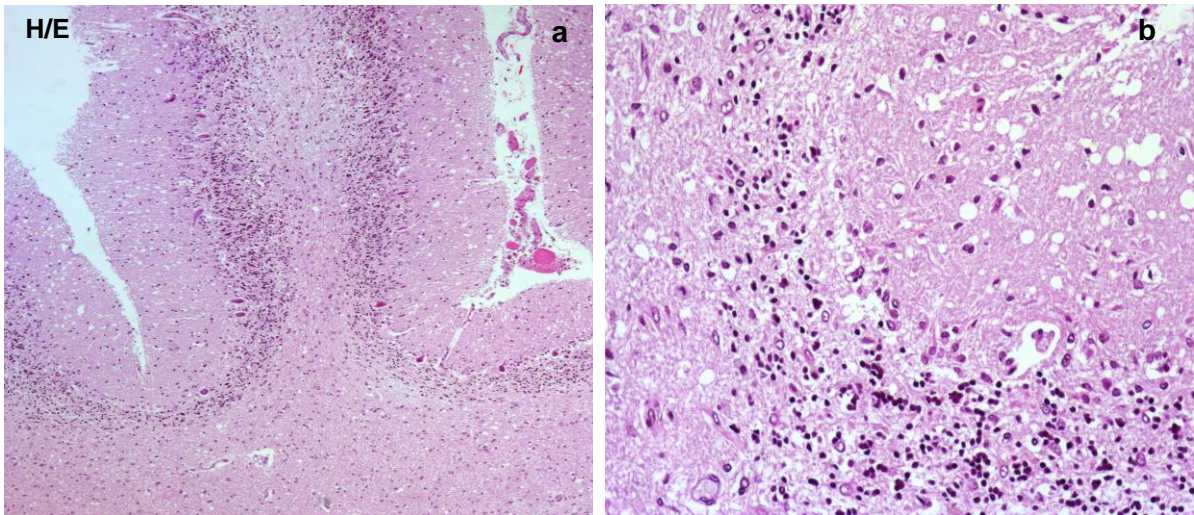


Fig. 16 Hallazgos histopatológicos en la capa granular de muestras humanas 50x (a) y 200x (b).

Aunque no fue posible observar en la totalidad de los casos estudiados, fue evidente un engrosamiento de las neuritas de las células de Purkinje en gran parte de ellos (Fig. 23).

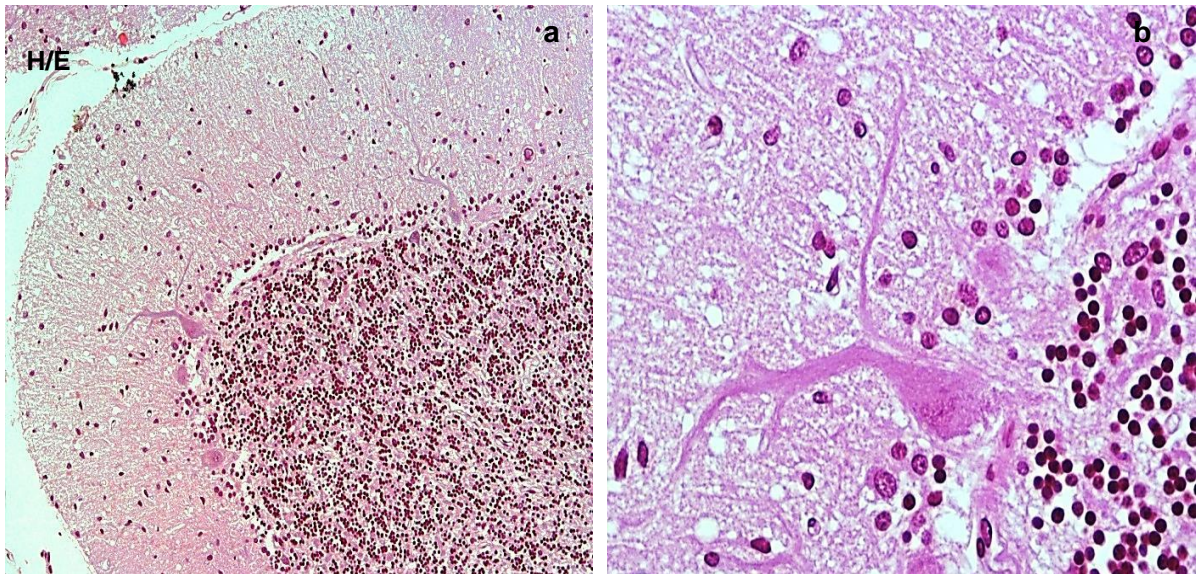


Fig. 17 Engrosamiento de las neuritas de las células de Purkinje evidenciadas mediante tinción con H/E (50x (a) y 400x (b)).

RESULTADOS

Sólo una de las muestras mostró la presencia de agregados proteicos característicos de las EET humanas (rosetas floridas) dispersas en la capa granular y sustancia blanca (Fig. 24).

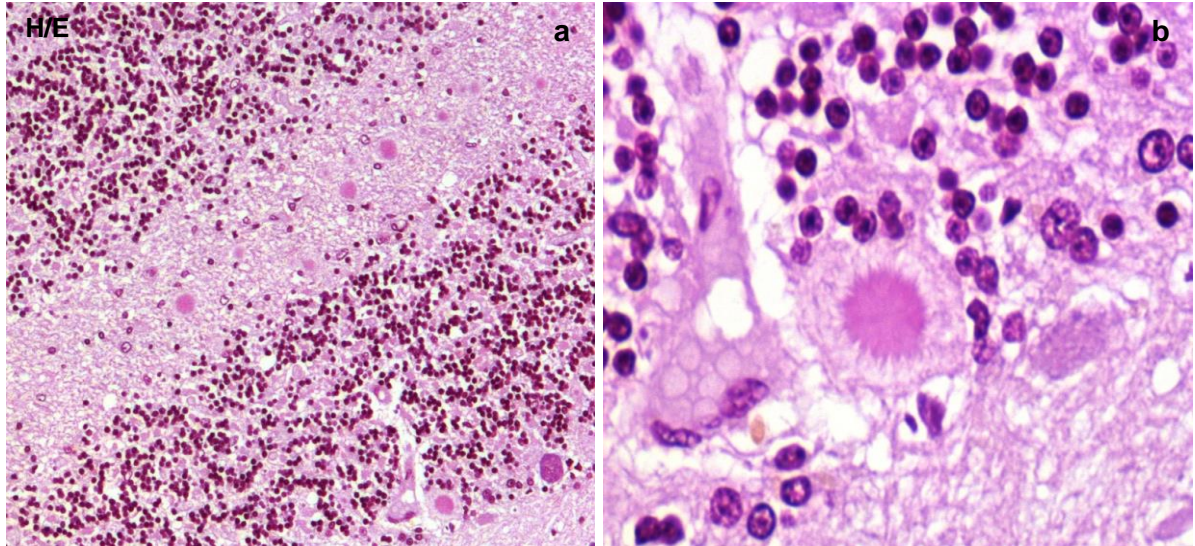


Fig. 18 Rosetas floridas localizadas en sustancia blanca y capa granular de una muestra de cerebelo de un enfermo de ECJ evidenciada por tinción con H/E, 100x (a) y 630x (b).

Mientras, en un gran número de casos se observó una serie de agregados degenerados y/o en formación tanto en la capa de las células de Purkinje (Fig. 25 a, b), como en la capa molecular (Fig. 25 c, d).

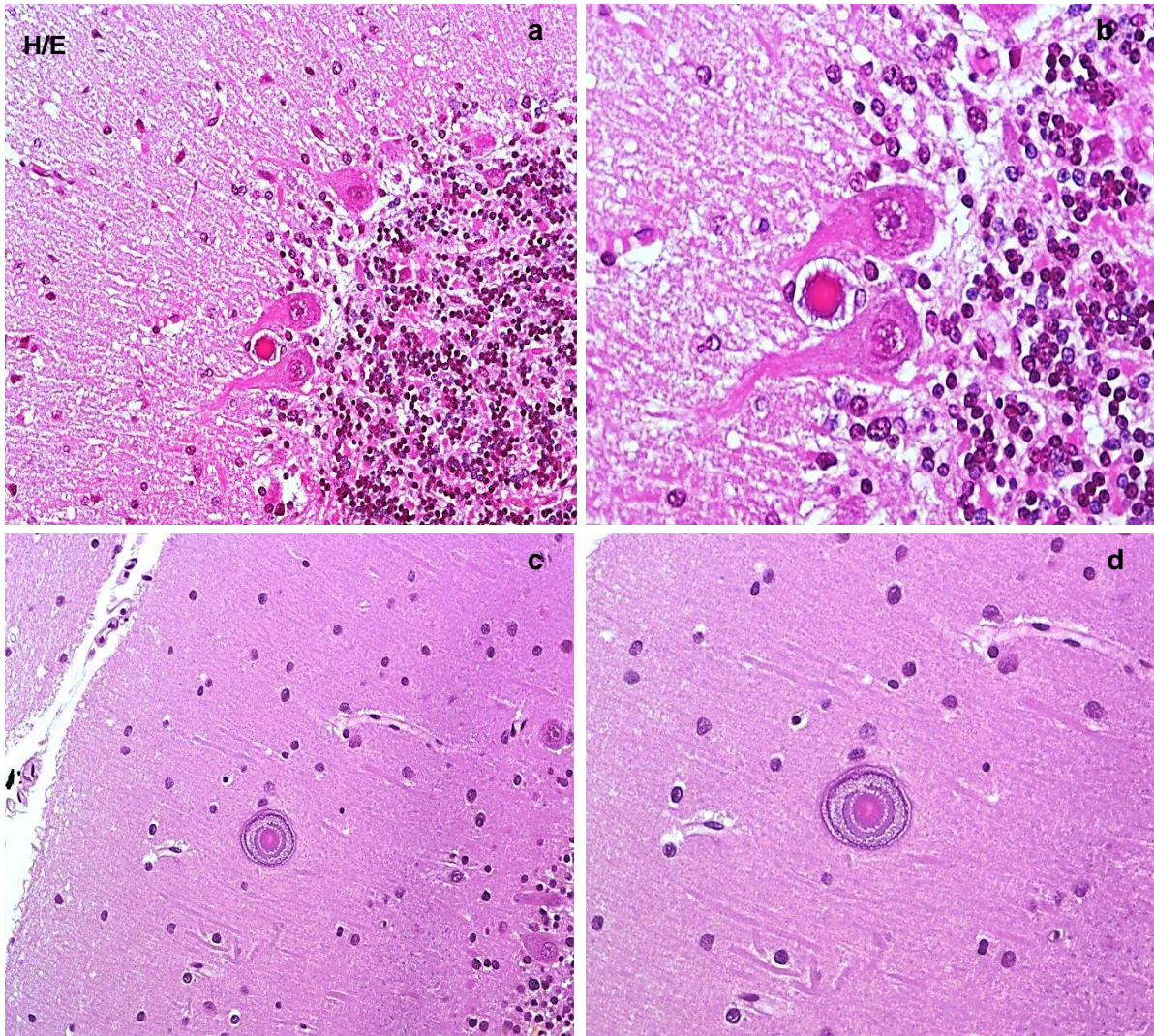


Fig. 19 Agregados degenerados y/o en formación en una muestra de cerebelo procedente de un enfermo de ECJ visualizado mediante tinción con H/E, localizada en la capa de células de Purkinje (200x (a), 400x (b)) y en la capa molecular (200x (c), 400x (d)).

I.6.7. Detección de GFAP

Las observaciones realizadas en relación con los elementos GFAP positivos en las muestras procedentes de los controles negativos demostraron una intensa reactividad principalmente en sustancia blanca, donde se observó una morfología predominantemente estrellada (Fig. 26). Sin embargo, en la capa granular se observó una escasa reactividad frente a GFAP. La reactividad aumentó de nuevo en la zona próxima a las células de Purkinje y en la capa molecular en concreto, correspondiendo con la glía de Bergmann (Fig.27).

RESULTADOS

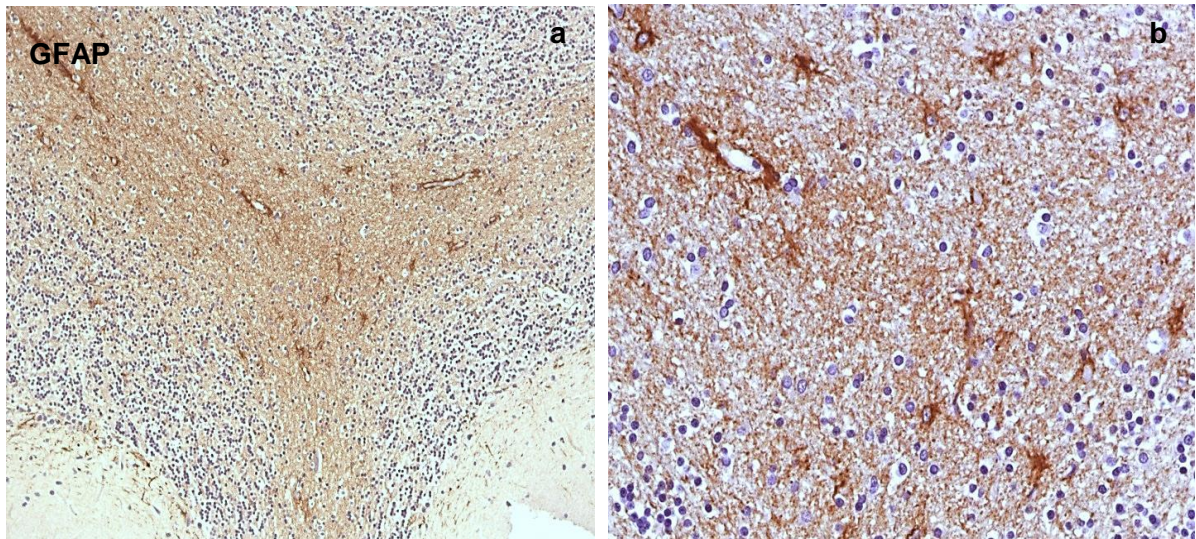


Fig. 20 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un control negativo (a) 100x y (b) 400x.

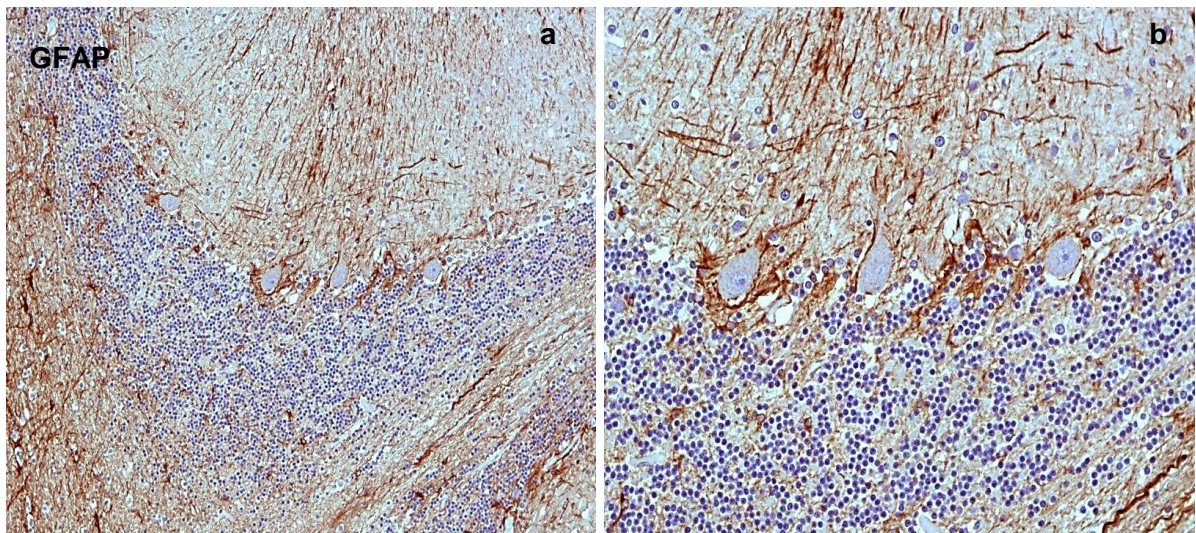


Fig. 21 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un control negativo (a) 50x y (b) 400x.

Los resultados obtenidos en la valoración de las muestras procedentes de pacientes de ECJ con respecto a la reactividad de la GFAP, permitieron clasificar las muestras estudiadas en dos grupos.

Un primer grupo evidenció un aumento de formas GFAP inmunorreactivas en la sustancia blanca y capa granular, así como en la capa molecular con morfología fibrilar correspondiente con la glía de Bergmann (Fig. 28).

RESULTADOS

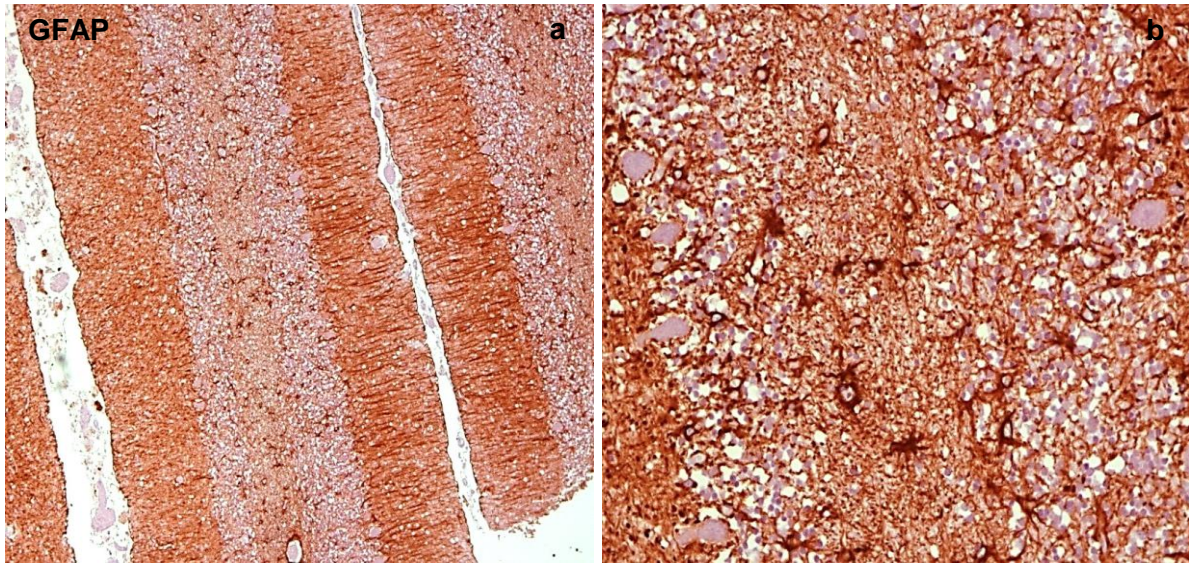


Fig. 22 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un paciente de ECJ (a) 50x y (b) 200x.

El otro grupo observado mostró cierta similitud con los controles negativos expresando una menor inmunorreactividad frente a la GFAP. Los depósitos en la sustancia blanca, presentaban principalmente morfología estrellada (Fig. 29).

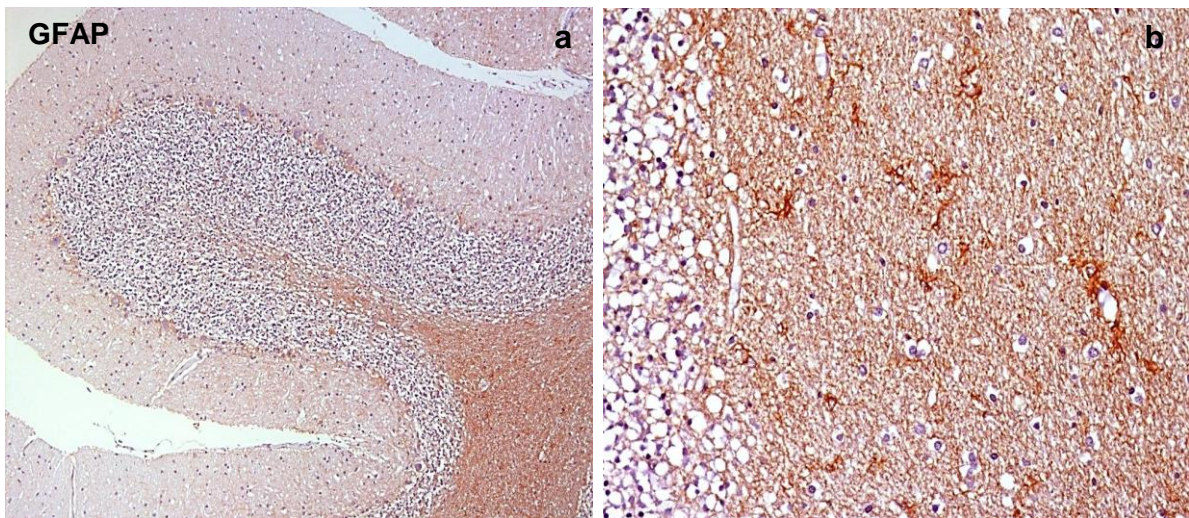


Fig. 23 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un paciente de ECJ (a) 50x y (b) 200x.

Una observación que cabe destacar en el segundo grupo observado fue que la inmunorreactividad en la capa molecular, coincidente con la glía de Bergmann se observó claramente disminuida, sin embargo en la zona cercana a

RESULTADOS

las células de Purkinje se evidenció inmunoreactividad en la periferia y cercana a éstas (Fig. 30).

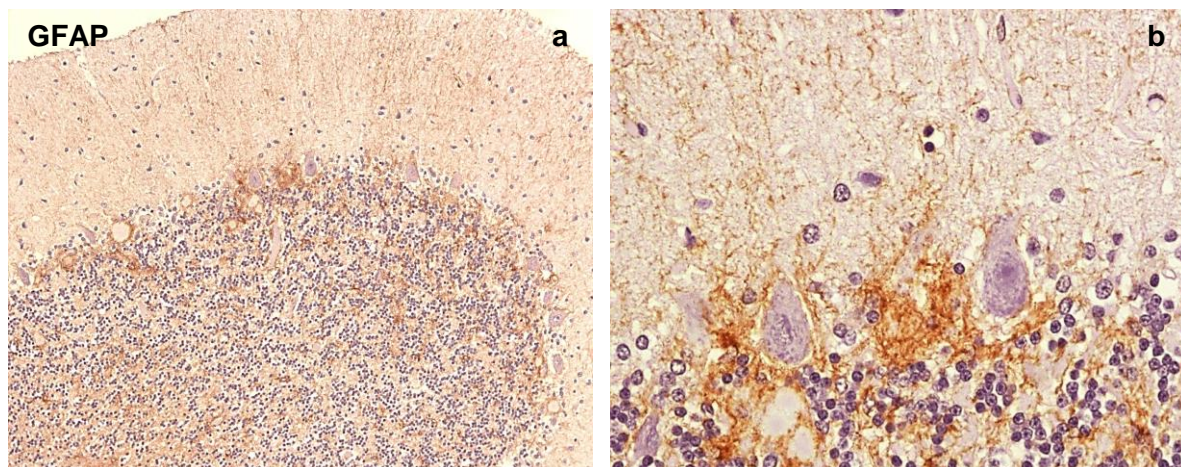


Fig. 24 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un paciente de ECJ (a) 50x y (b) 200x.

En la única muestra donde se observó la presencia de rosetas floridas se detectó positividad frente a GFAP alrededor de ellas (Fig. 31).

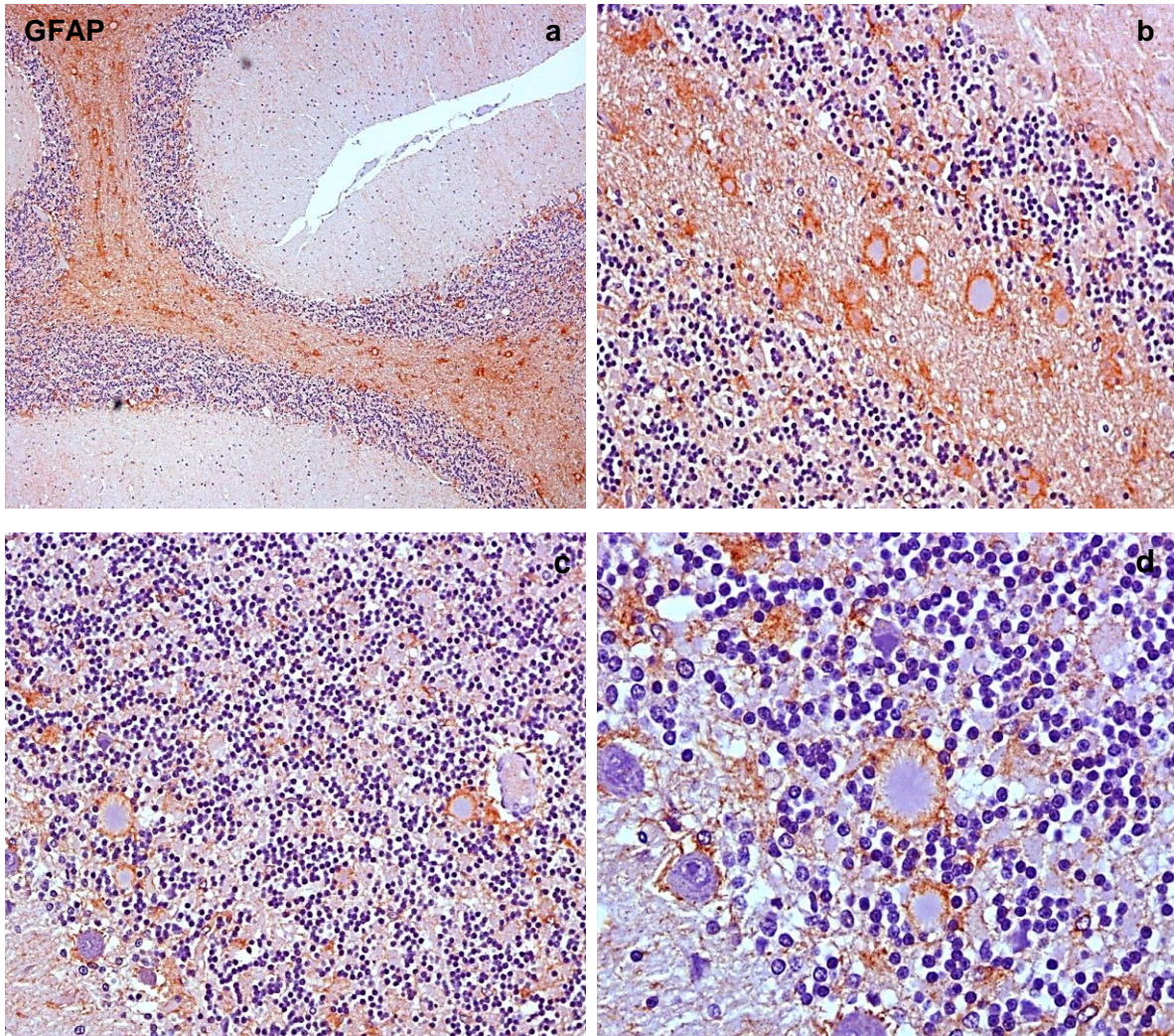


Fig. 25 Imagen de rosetas floridas GFAP positivas en sustancia blanca (a) 50x y (b) 200x y en la capa granular así como en la zona próxima a las células de Purkinje (c) 200x y (d) 400x.

I.6.8. Microgliosis

La valoración de las muestras utilizadas como controles negativos en relación con la microglía reactiva evidenció una presencia y distribución abundante y dispersa en la capa molecular, granular y sustancia blanca presentando una morfología predominantemente ramificada. Sin embargo, una de las muestras presentó una distribución diferente, evidenciando una morfología globular con características fagocíticas (Fig. 32).

RESULTADOS

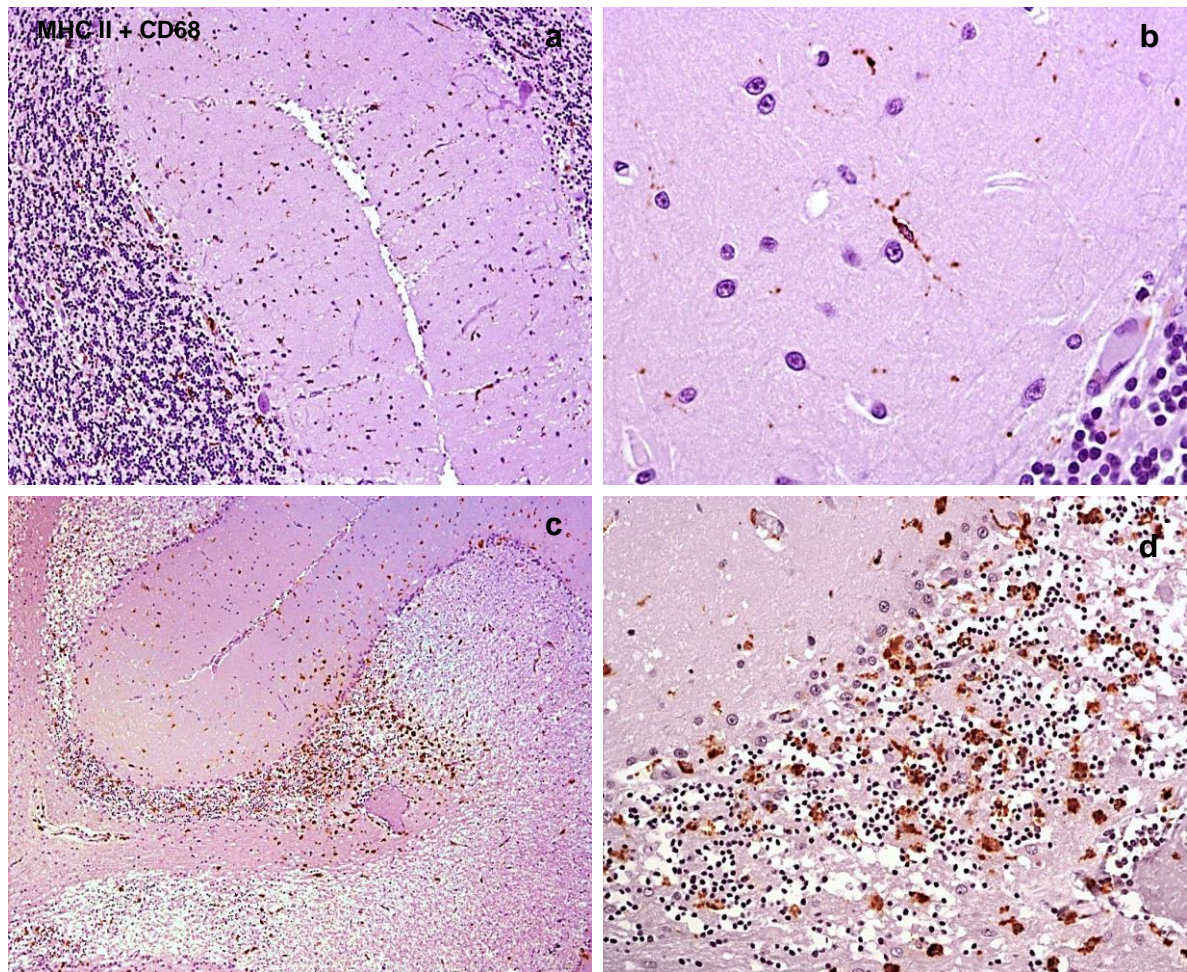


Fig. 32 Imagen obtenida mediante inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en una de las muestras control negativo (a) 100x y (b) 400x y en otro control negativo que presentó una morfología predominantemente globular (c) 50x (d) 200x.

En base a las observaciones realizadas mediante la técnica de inmunohistoquímica para detectar microglía reactiva sobre las muestras de pacientes diagnosticados de ECJ, de nuevo fue posible clasificar en tres grupos los resultados obtenidos, teniendo en cuenta el patrón de distribución y la presencia de microglía reactiva en las distintas capas que forman el cerebelo. El primer grupo, constituido por siete muestras, se observó la microglía reactiva distribuida, tanto en la sustancia blanca, como en la capa molecular y granular (Fig. 33 a-b).

RESULTADOS

El segundo grupo estaba formado por doce muestras, en las que la mayor inmunotinción se localizó en las capa molecular y granular, mientras que en la sustancia blanca se observó una evidente disminución en relación a las otras 2 capas (Fig. 33 c-d).

El tercer grupo esta formado por once muestras, el mayor grado de inmunotinción se localizó en la sustancia blanca (Fig. 33 e-f). Cabe mencionar que en este grupo seis muestras evidenciaron una disminución importante de la inmunotinción.

RESULTADOS

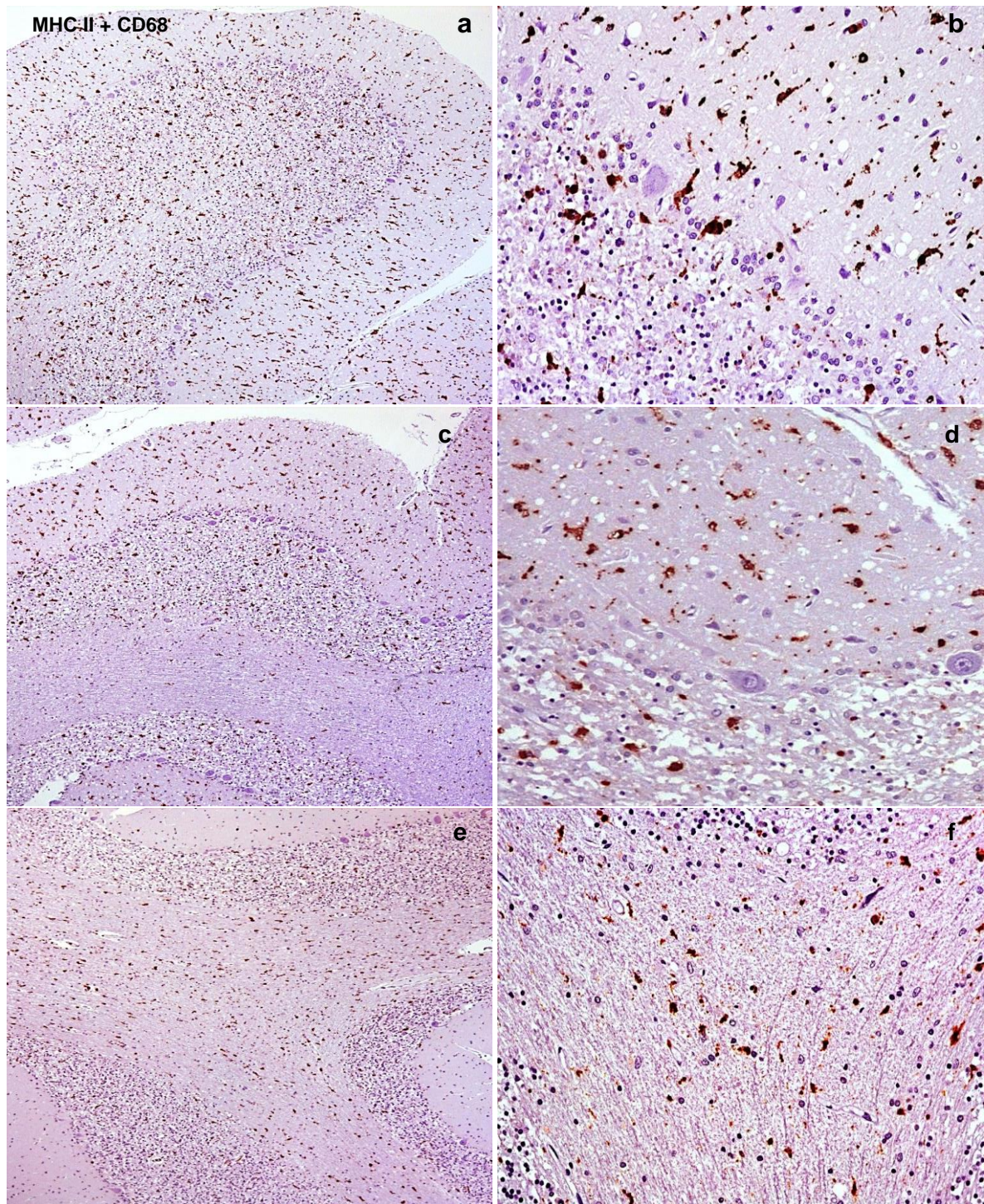


Fig. 26 Imagen obtenida mediante inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en muestras procedentes de enfermos de ECJ que presentaron diferentes patrones de distribución en todas las capas valoradas (a) 50x (b) 200x; preferentemente en la capa molecular y granular (c) 50x (d) 200x; y en la sustancia blanca (e) 50x (f) 200x.

En tres muestras procedentes de pacientes de ECJ se observó un aumento llamativo de la activación de la microglía, al observarse en su mayoría formas

RESULTADOS

ameboides (Fig. 34) en ningún caso se evidenció una relación directa entre la microglía reactiva y las células de Purkinje.

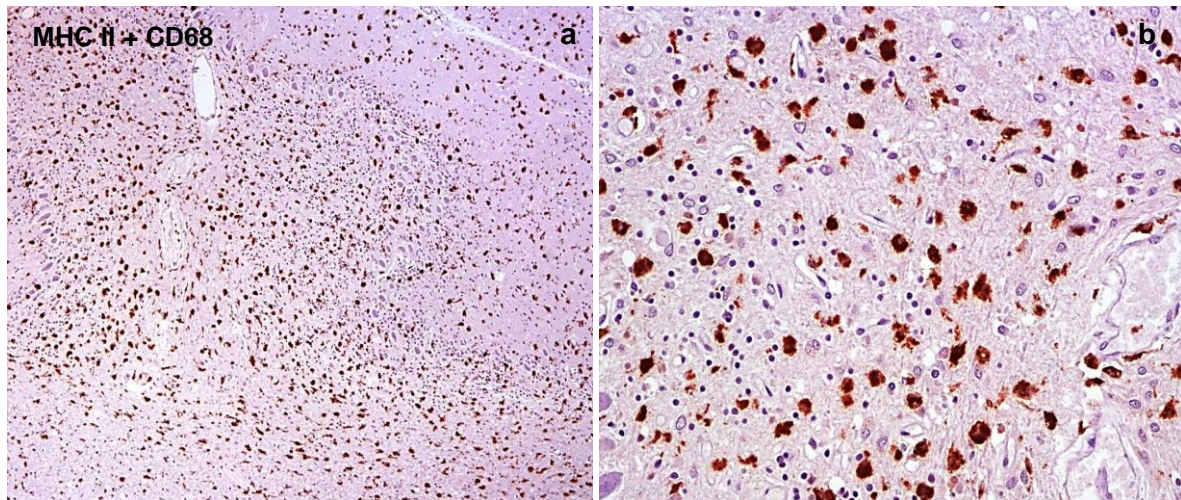


Fig. 27 Imagen obtenida mediante inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en muestras procedente de uno de los pacientes de ECJ que presentaron morfología predominantemente ameboide (a) 50x (b) 400x.

I.6.9. Microscopia confocal

Los resultados obtenidos mediante microscopia confocal en los estudios de co-localización confirmaron que tanto, la astrogliá como la microglía reactiva en las muestras utilizadas como controles negativos, se distribuía en las diferentes capas tal y como se había descrito mediante inmunomarcage en la técnica de microscopia óptica. Sin embargo, no se observó ninguna relación directa entre la microglía y los astrocitos.

Al contrario de lo observado en las muestras negativas, en las muestras positivas, se evidenció reactividad de los astrocitos en relación a la microglía reactiva dispersa en la capa granular, observándose como los astrocitos envuelven a la microglía reactiva (flecha) (Fig. 35).

RESULTADOS

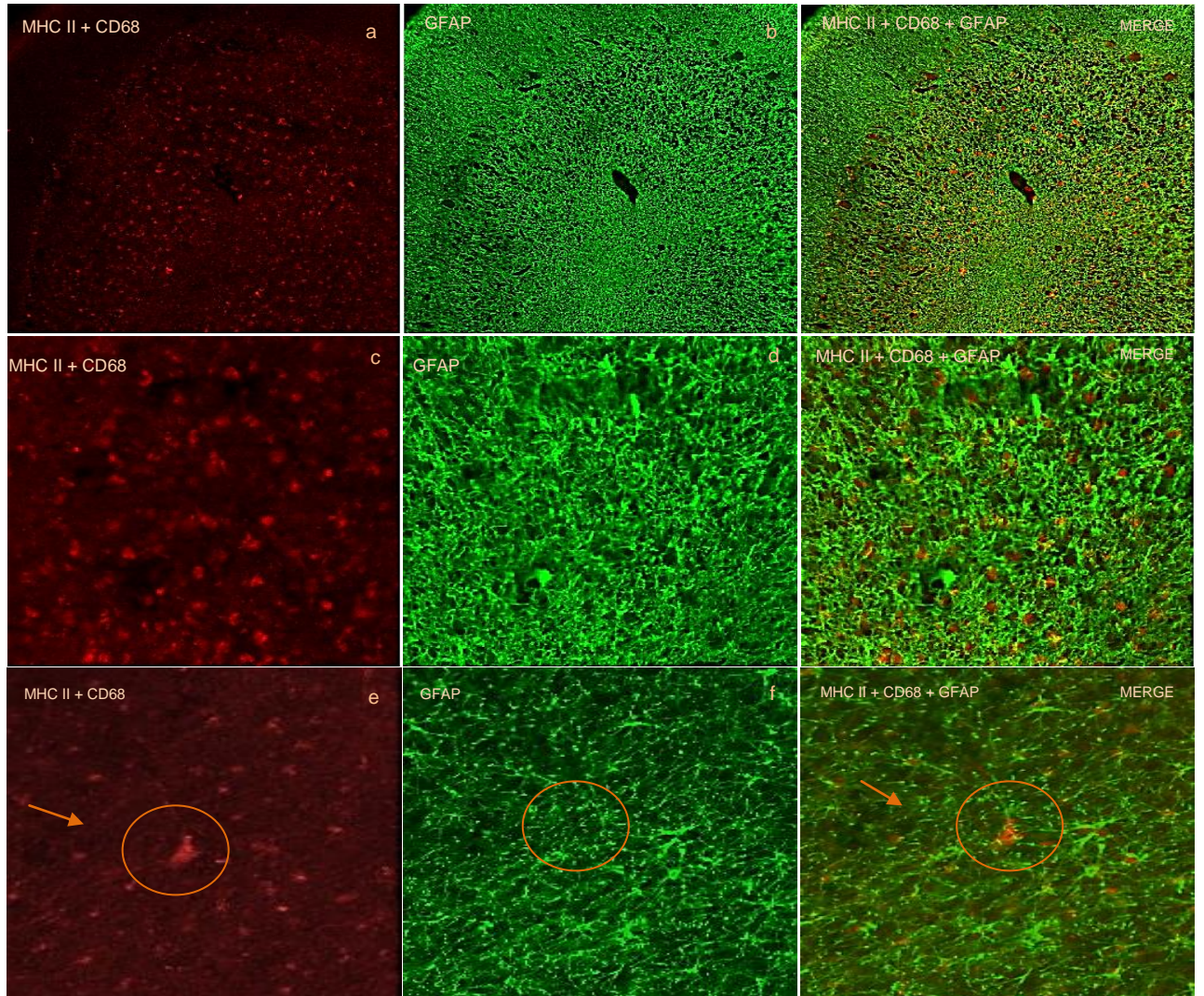


Fig. 28 Estudio de co-localización de la microglía reactiva (a, c, e) y astrogliá (b, d, f) en muestras procedentes de pacientes de ECJ 10x (NA-03) y 20x (NA-05) Crop 2.

DISCUSSION

VI.D ISCUSION

La acumulación de PrPsc en las neuronas está totalmente aceptada en relación con las EET (Rezaie *et al.* 2001). Sin embargo, el papel de las células de la glía se ha descrito meramente como un hallazgo histopatológico característico en este grupo de enfermedades que se observa en el tejido dañado. Ésta ha sido poco estudiada en el desarrollo de las EET. Sólo se ha propuesto que una interacción entre el agente y el genotipo del huésped puede influir en el desarrollo de la enfermedad. El estudio del comportamiento de la glía en estas enfermedades permitirá aportar más información sobre la evolución de éstas.

Uno de los objetivos que se proponían, en el presente estudio consistía en demostrar la implicación real de la astrogliá en el progreso del Scrapie, lo que se ha logrado al evidenciar una clara relación entre el estadio clínico de la enfermedad y la respuesta astrocítica en la zona estudiada, el cerebelo.

En el presente trabajo se han descrito por primera vez diferentes patrones relativos a la morfología y distribución de los astrocitos presentes de manera común en todos los animales de una misma etapa clínica. La respuesta astrogliá ha sido indiscutiblemente asociada al progreso de la enfermedad, desde la fase pre-clínica hasta la fase terminal. Sin embargo, no se ha demostrado asociación con la edad, su origen o el genotipo, incluso a pesar de las diferencias esperables en función de estas variables, a diferencia de los hallazgos de otros estudios relacionados con la edad (Oswald *et al.* 2005). Tras haber realizado una exhaustiva revisión bibliográfica, no se han encontrado estudios comparativos similares al que aquí se presenta sobre la interacción entre las neuronas del

DISCUSION

cerebelo, y en particular las células de Purkinje, y los astrocitos en distintas fases de evolución de la enfermedad, probablemente debido a la dificultad de la disponibilidad de muestras de las diferentes etapas clínicas.

En este estudio se ha demostrado tanto la hipertrofia e hiperreactividad de los elementos GFAP inmunopositivos en los procesos gliales, formando redes perineuronales, como un aumento de los núcleos astrogiales (hiperplasia glial). Los astrocitos de las tres capas de la corteza cerebelosa parecen participar en esta respuesta, aunque de forma especial los situados en la capa de células de Purkinje y en la de las células granulares. En estos astrocitos se observó un constante e intenso aumento de la inmunorreactividad frente a GFAP, que persiste en la fase terminal aún a pesar de que una marcada pérdida neuronal ha sido confirmada.

Por otro lado, se ha evidenciado una estrecha asociación entre las áreas con mayor inmunorreactividad frente a GFAP y las áreas de mayor concentración de depósitos de PrPsc, especialmente a nivel de las neuronas de Purkinje. Este hecho parece indicar que podría existir a nivel de esta capa un microambiente específico, diferente a lo observado en las otras capas que pudiera inducir la formación y/o acumulación de la proteína prión. O tal vez esta intensa reacción astrogial podría estar también asociada con un mecanismo de eliminación o control de depósitos de esta proteína.

De cualquier modo, los astrocitos poseen un papel importante en el progreso de la enfermedad del Scrapie, ya sea por estar implicados en algunos aspectos de la generación de la PrPsc (en su entrada o propagación en el tejido, o bien en su producción y/o acumulación) o en la defensa del organismo

DISCUSION

huésped frente a ella. Para dilucidar esta cuestión se realizaron estudios de microscopía electrónica.

Del mismo modo, los resultados proporcionados por el examen histopatológico, así como por valoración inmunohistoquímica han demostrado que las células de Purkinje desempeñan un papel relevante en las EET, siendo el tipo celular más dañado y a su vez el más protegido por las células de la glía en la zona estudiada. También resulta interesante señalar que el engrosamiento de las neuritas (axones y dendritas) de éstas células descrito en este trabajo, había sido previamente referido en la especie humana, pero no en las EET animales (Gutiérrez *et al.* 2006; Furouka *et al.* 2011).

La principal función del cerebelo es la coordinación de la actividad motora así como el mantenimiento del equilibrio. De hecho, las enfermedades de este área encefálica suelen estar asociadas a trastornos de asinergia del tronco o extremidades (Rapoport *et al.* 2000). Pero otras importantes funciones tales como la cognición y el comportamiento también figuran entre ellas.

En concreto, las células de Purkinje, que constituyen la vía eferente de la corteza cerebelosa, desempeñan un papel fundamental en el sistema de circuitos del cerebelo y, como consecuencia, su lesión o muerte funcional conlleva síntomas clínicos como ataxia, dismetría, disartria, disfagia, temblores o hipoplasia (Sarna *et al.* 2003; Schmahmann 2004). La alteración observada en las células de Purkinje de los animales afectados de Scrapie justificaría los síntomas clínicos observados en las ovejas afectadas de la enfermedad, por otra parte característicos de las enfermedades priónicas, que incluye ataxia en todos los casos (Sakaguchi *et al.* 1996).

Por otra parte, teniendo en cuenta los resultados recientemente publicados donde se describe la ausencia de PrPsc en el cuerpo neuronal de las células de Purkinje (Sarasa *et al.* 2012), explicar el hecho de que las células más dañadas en el área de estudio no muestren acumulación de PrPsc resulta realmente complicado en base a la hipótesis de la proteína prión (Prusiner *et al.* 1982). Tal vez resultaría más fácil considerar en este caso la posibilidad de una relación no exclusiva entre la PrPsc y la neurodegeneración (Collins *et al.* 2005).

Resulta interesante mencionar que en otros trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer, la neurodegeneración no requiere la acumulación de depósitos proteicos intracelulares. O incluso cabe la posibilidad de que exista una estrecha conexión entre las células gliales y las alteraciones neurodegenerativas, que sería compatible con las imágenes de microscopía electrónica obtenidas en este estudio, que podría hacer pensar que la degeneración de las células gliales pudieran ser las responsables de la vacuolización perineuronal.

Por otra parte, la intensa reactividad de la glía de Bergman, descrita aquí por primera vez en el cerebelo de animales afectados de Scrapie, ya que había sido descrito en las EET humanas (DeArmond *et al.* 1999) y en roedores infectados experimentalmente (Furouka *et al.* 2011), pero no en la infección animal natural, apoyaría aún más la hipótesis sobre esta asociación entre la glía y la neurodegeneración. Se conoce que la glía de Bergmann está íntimamente relacionada con las células de Purkinje en el cerebelo adulto (Yamada *et al.* 2002), lo que quedarían los hallazgos referidos anteriormente en relación con la glía de Bergmann y las células de Purkinje.

DISCUSION

El patrón estrellado de los depósitos de PrPsc en relación con la barrera meníngea observada en este estudio contribuye de nuevo a evidenciar el papel esencial de las células gliales en la propagación de la PrPsc. En particular, parece demostrar una posible entrada de la proteína prión o una vía de propagación desde la barrera hematoencefálica hacia los núcleos profundos del cerebelo. Por otro lado, la disminución del número de depósitos de PrPsc evidenciada en la sustancia blanca en las etapas terminales de la enfermedad apoyaría la vía nerviosa como otra entrada alternativa para la PrPsc. Por lo tanto, como ya se propuso anteriormente (Graeber *et al.* 2010; Sarasa *et al.* 2012), parecen coexistir como rutas de entrada y diseminación, tanto la vía nerviosa como la hematógica.

Se sabe que las neuronas, células gliales y vasos sanguíneos se organizan en unidades neurovasculares bien estructuradas que están implicados en la regulación del flujo sanguíneo encefálico; de hecho, estudios recientes han demostrado el papel crucial desempeñado, no sólo por las células endoteliales, sino también por la glía en la regulación de la barrera hematoencefálica (Iadecola 2010). Esta barrera actúa como una barrera física, porque los complejos de unión entre células endoteliales adyacentes obligan a que la mayoría del tráfico molecular se realice siguiendo una ruta trans-celular, en lugar de seguir una vía como se produce en el endotelio paracelular a través de las uniones (Wolburg *et al.* 2002; Hawkins *et al.* 2005).

La barrera hematoencefálica desempeña varias funciones entre éstas, la irrigación encefálica con nutrientes esenciales y el control del flujo de salida de muchos productos de desecho y la regulación del intercambio iónico de fluidos

entre la sangre y el encéfalo (Begley *et al.* 2003; Abbott *et al.* 2006). Actualmente existe la evidencia de que los astrocitos son los responsables de regular gran parte de las funciones de la barrera hematoencefálica (Dehouck *et al.* 1990; Rubin *et al.* 1999). La función de esta barrera se ve alterada en un alto número de patologías. Así, se conoce que las alteraciones de la glía y el endotelio, parecen estar implicados en diversos trastornos, como la enfermedad de Alzheimer, en la que la acumulación de β -amiloide, se encuentra a menudo en la periferia de los vasos sanguíneos, produciendo toxicidad en el endotelio y en los astrocitos, observándose incluso antes de la pérdida neuronal (Iadecola 2004). En base al hecho de que los astrocitos están tan implicados en la alteración de la homeostasis, existe la posibilidad de que constituyan un medio de transporte para la proteína prión y sean utilizados como "caballo de Troya" para atravesar la barrera hematoencefálica y llegar a las células de Purkinje como células diana. Sin embargo, son necesarios más estudios para profundizar en los procesos que ocurren a nivel de la barrera hematoencefálica.

Por ello, no está claro si estos trastornos en la homeostasis como consecuencia de las deficiencias de la barrera, contribuyen y/o exacerban la posterior neuropatología (Zlokovic 2005), o es realmente el intercambio real de la PrPsc el hecho más importante en el progreso de la enfermedad.

La otra población glial objeto del presente trabajo, la microglía, es la población celular fagocítica del encéfalo. En condiciones fisiológicas, se encuentra en estado de reposo, transformando su morfología en el caso de que ocurra algún daño o alteración en el tejido nervioso. En los trabajos realizados por Kreutzberg (Kreutzberg 1996), utilizando nervios faciales de rata localizados

fuera del encéfalo, y con sus cuerpos celulares hacia el interior de la barrera hematoencefálica, se observó que al sufrir una lesión las células de la microglía que se localizan cercanas a la zona dañada, colaboraban en el proceso de remodelación. De hecho, se asume que toda desviación respecto al estado de normalidad en el encéfalo, desencadena la activación de la microglía variando su morfología para llevar a cabo su labor fagocítica (Kettenmann *et al.* 2011).

Por supuesto, la presencia de muerte neuronal induce el cambio de morfología de la microglía hacia un fenotipo ameboide con capacidad fagocítica (Schwab *et al.* 2001; Liu *et al.* 2003; Langmann 2007). Este cambio morfológico se evidenció en las muestras de nuestro estudio.

En 4 de los animales estudiados, 2 en fase clínica y 2 en fase terminal, se observó mayor reactividad de la microglía que en el resto de las muestras evidenciando una retracción de sus prolongaciones y adoptando una forma ameboidea para alcanzar la zona dañada (Kettenmann *et al.* 2011). No obstante, las observaciones realizadas en la mayoría de los animales estudiados en las distintas fases clínicas de la enfermedad parecen indicar que la microglía reactiva no está involucrada.

En el trabajo realizado por Priller *et al.* (2006) utilizando ratones inoculados de Scrapie, observó que la cantidad de microglía disminuyó en el cerebelo. Al haber utilizado un modelo experimental de ratones con edades avanzadas esta ausencia de reacción microglial podría justificarse en relación con la edad. Los resultados de este experimento podrían apoyar la hipótesis de la posible disminución de estas células asociadas al envejecimiento, ya que los animales utilizados en nuestro trabajo eran todos adultos infectados por Scrapie de forma

natural. No obstante otros estudios previos habían descrito que no existía ninguna modificación en el número de microglía en diversas regiones del encéfalo de ratones envejecidos. Dichos estudios sobre el envejecimiento y su relación con la microglía, postulaban que mientras en diversas zonas del encéfalo se observaba una disminución de la microglía reactiva, sin embargo tras la activación inducida por una lesión, observaron un aumento de la cantidad de microglía reactiva en la zona de la lesión (Perry *et al.* 1993; Ogura *et al.* 1994).

Otro factor que puede afectar a la presencia de microglía reactiva en el cerebelo fue observado en ovinos afectados por Scrapie de forma natural, utilizando la técnica de inmunohistoquímica con doble marcaje. Ésta técnica permitió detectar depósitos de PrPsc en algunas células de la microglía, presentando éstos una morfología granular perinuclear (Andreóletti *et al.* 2002a). Esto puede explicar el efecto secuestrante de la PrPsc por la microglía reactiva y como afecta a la patogénesis de la enfermedad y a la activación temprana de la microglía, antes de que aparezcan otras lesiones en el cerebelo infectado por scrapie. Al ser la activación de la microglia un factor determinante en el daño neuronal asociado al scrapie(Williams *et al.* 1994; v Eitzen *et al.* 1998; Cook *et al.* 2001) (Heppner *et al.* 2005; Simard *et al.* 2006). La microglía puede incorporar solo pequeñas cantidades de PrPsc permitiendo su replicación dentro de esta de forma pasiva. En una exposición experimental utilizando microglía cultivada en tejido infectado con Scrapie, y en contacto con grandes cantidades de PrPsc, se observó que la capacidad fagocítica de la microglía se saturaba. De acuerdo con este estudio, la respuesta de la microglía a la presencia de PrPsc sería dependiente de la dosis (Priller *et al.* 2006).

DISCUSION

En nuestro estudio se observó que la microglía reactiva mostró principalmente un patrón de distribución cercano a las células de Purkinje; este hallazgo es coherente con el hecho de que la degeneración de estas neuronas como detonante de la activación microglial (Gao *et al.* 2003) ya que la microglía activada se agrupa alrededor de las neuronas, especialmente en las neuritas y los axones (Zhou *et al.* 2005).

Las observaciones de nuestro estudio permiten reafirmar la interacción entre las células de Purkinje y la microglía reactiva ya que cuando las neuronas alteran su morfología o mueren por una enfermedad neurodegenerativa crónica, la microglía se activará a partir del momento en que el nivel de excitabilidad de las células de Purkinje disminuya con el fin de reducir el grado de lesión. La microglía controla la respuesta inmune y fagocítica tras el daño cerebelar, siendo una de los más importantes determinantes del curso de patología de las enfermedades ocasionadas por priones (Hanisch *et al.* 2007; Ransohoff *et al.* 2009).

En la enfermedad de Creutzfeldt Jacob (ECJ) una de las características neuropatológicas es la marcada pérdida de células de Purkinje y de las células granulares del cerebelo que se consideran como lesiones características de la forma esporádica de la enfermedad. En nuestro trabajo identificamos diferentes patrones histopatológicos que han sido explicados anteriormente. Apoyándonos en estas observaciones relacionadas con la distribución de la vacuolización y la gliosis, nuestro estudio evidencio diferentes variantes, que han sido descritas por diferentes investigadores y están relacionadas con el genotipo de los pacientes

diagnosticados de ECJ (Brownell *et al.* 1965; Gomori *et al.* 1973; Jellinger *et al.* 1974).

Las observaciones descritas en este trabajo en relación con la degeneración espongiiforme en la capa molecular de algunos casos de ECJ, acompañada de degeneración espongiiforme de la capa granular y sustancia blanca, la gliosis y la reactividad de la glía de Bergmann, habían sido descritos como características comunes en la ECJ esporádica (clásica) (Bell *et al.* 1997; DeArmond *et al.* 1997).

Se han descrito al menos 5 tipos diferentes de patrones histopatológicos relacionados con las áreas e intensidad de las lesiones y las características del cuadro clínico. Nuestro estudio ha permitido describir diferentes tipos de vacuolización neuronal y distribución de los astrocitos así como de la microglía. En la ECJ esporádica, la principal zona de daño en el tejido se localiza en las regiones occipital y temporal así como tálamo y cerebelo, con predominio de espongiosis, pérdida neuronal y gliosis. Los diferentes patrones de vacuolización varían en cantidad, tamaño de vacuolas y área de localización con dependencia al genotipo que pertenece (Cartier *et al.* 2012). Estos autores observaron esas características en el 75% de pacientes masculinos, todos ellos afectados de la forma esporádica de ECJ. En nuestro trabajo dichas alteraciones fueron observadas en un grupo mayor de pacientes femeninos. No obstante es preciso mencionar que en España la mayoría de pacientes diagnosticados de ECJ son del sexo femenino, con un porcentaje del 51.5% en un periodo entre el año 2001 y 2009.

DISCUSION

Los hallazgos histopatológicos de las muestras humanas de pacientes con ECJ, que hemos observado han consistido en un engrosamiento de las neuritas, cortas o de mayor longitud, de forma similar a las descritas por (Adams *et al.* 1974). Estos engrosamientos no se observaron en la totalidad de las muestras, ya que sólo algunas presentaron estas alteraciones que por otra parte, también han sido descritos en la enfermedad de Alzheimer (Gutiérrez *et al.* 2006). La importancia de esta observación esta basada en el hecho que en la mayoría de descripciones histopatológicas relacionadas a ECJ, no mencionan esta alteración de las células de Purkinje.

La identificación de placas amiloides o de tipo Kuru, también llamadas rosetas floridas, en una de las muestras estudiadas, es una característica compatible con el subtipo MV2. En nuestro caso, las placas se observaron con mayor frecuencia en la capa de células de Purkinje y en la capa granular del cerebelo y se caracterizaban por estar constituidas por una placa hialina eosinofílica con núcleo y halo pálido. Asimismo, se observó la presencia de estas placas en sustancia blanca, lo que ya se ha descrito anteriormente (Adams *et al.* 1974). Cabe hacer mención que nuestro estudio evidenció que en la capa molecular no había presencia de rosetas floridas, aunque si han si han sido descritas en todas las capas que forman el cerebelo (Ironsides *et al.* 2005). Sin embargo en nuestro caso se observaron depósitos o agregados con formas irregulares que no coincidían en forma o apariencia con las rosetas floridas.

El aumento del número de astrocitos reactivos confirma los resultados publicados anteriormente que describen reactividad astrocítica en las capas molecular, granular y sustancia blanca (Muhleisen *et al.* 1995);(Van Everbroeck

et al. 2002). La detección inmunológica frente a GFAP en los cerebelos afectados de pacientes con ECJ permitió establecer una relación entre el desarrollo de la enfermedad y la participación de los astrocitos, que en todos los casos estudiados se observan reactivos en las diferentes capas. Aunque no tenemos conocimiento de la fase clínica de los pacientes, es preciso indicar que la astrogliosis permite establecer una aproximación con pacientes que se pudiesen encontrar en la fase clínica o la fase terminal de ECJ (Manuelidis *et al.* 1987). Estos autores indican que la fase inicial o pre-clínica, no se puede establecer mediante la presencia de astrogliosis, únicamente por las manifestaciones clínicas del individuo.

En la fase clínica se observa astrogliosis generalizada y en la fase terminal los astrocitos se observan rodeando a las células de Purkinje y sus dendritas. En la fase terminal, la astrogliosis se observó disminuida en regiones donde el cambio esponjiforme era evidente. Este hecho está relacionado con los genotipos de los pacientes afectados de ECJ.

La PrPsc en la ECJ puede ser transportada por la microglia, que muestra un fenotipo característico. Hasta hace poco tiempo se asumía que los agentes de las EET se replicaban exclusivamente en las neuronas, pero los estudios actuales no apoyan esto. En cualquier caso, el hallazgo de la infectividad microglial puede explicar cómo estos agentes actúan antes de la aparición de los cambios patológicos (Baker *et al.* 2002). La distribución de la microglía reactiva se ha descrito en casos de ECJ esporádica asociada con la fagocitosis y relacionada directamente con los depósitos de PrPsc en el tejido cerebelar. (Rezaie *et al.* 2001). Aunque en nuestro trabajo no logramos establecer esta

DISCUSION

relación con los depósitos de PrPsc, la morfología y distribución de la microglía en las diferentes capas del cerebelo nos permitieron establecer patrones de reactividad relacionada con la vacuolización.

La relación de los astrocitos con la microglia reactiva observada en las muestras de casos humanos estudiadas por nosotros deja claro que la participación de las células gliales esta relacionada con el desarrollo de la enfermedad. No podemos aclarar en que fase de la enfermedad interviene cada célula, sin embargo la activación de la microgliosis por la intervención de los astrocitos ha sido descrita en anteriores trabajos (Rezaie *et al.* 2001).

La variabilidad del perfil histopatológico de la vacuolización y su relación con la microglía reactiva esta relacionada directamente con el genotipo de los pacientes infectados de ECJ. Desafortunadamente no pudimos disponer de la información de los genotipos de los casos estudiados, por lo que no ha sido posible establecer esa relación en las muestras de nuestro estudio.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- I. En base a la relación que queda evidenciada en el presente estudio entre la distribución y morfología de los astrocitos y el estadio clínico en un modelo de Scrapie natural, se puede concluir que las células de la astrogía están implicadas en el progreso de la enfermedad.

- II. La implicación de la astrogía en la evolución de la enfermedad no depende de las variables que han sido valoradas en el presente estudio. En concreto, la edad, el genotipo del animal o el foco del que proceden.

- III. No ha sido posible establecer una asociación entre los cambios morfológicos y/o de distribución de la microglía reactiva y los diferentes estadios clínicos de la enfermedad en el modelo de Scrapie, por lo que esta población glial no parece estar implicada en la evolución de la enfermedad. Sin embargo, el comportamiento de este tipo de glía se ha encontrado claramente influenciado por el genotipo del individuo.

- IV. Los hallazgos histopatológicos observados en los animales afectados de Scrapie evidencian que las células de Purkinje son la principal célula diana de este grupo de enfermedades.

- V. El inmunomarcaje utilizado en el presente trabajo para reconocer específicamente la astrogía permitió la observación de un patrón fibrilar localizado en la capa molecular que coincide esencialmente con la glía de Bergmann, tanto en el cerebelo procedente de individuos afectados de ECJ como de Scrapie (en estadio terminal). Esta observación sugiere una implicación directa de este tipo celular en la reacción glial frente a las EET.

CONCLUSIONES

- VI. En los individuos afectados de ECJ estudiados ha sido posible determinar 3 patrones de distribución diferentes en relación con las células de la microglía reactiva que, de acuerdo con los resultados obtenidos en el modelo animal, probablemente se correspondan con los diferentes genotipos de los individuos para el gen PRNP.

- VII. Las principales observaciones realizadas en relación con el papel de la glía en el modelo de Scrapie natural (fase terminal) coinciden con las realizadas en los casos de ECJ, por lo que se confirma la validez del modelo animal para extrapolar resultados fiables al grupo de EET, en relación con esta población celular.

RESUMEN

VIII. RESUMEN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET), también llamadas enfermedades priónicas, pertenecen a un grupo de patologías neurodegenerativas con pronóstico fatal en todos los casos que afectan al ser humano y a algunas especies animales. Aunque la vía de transmisión difiere según el tipo de EET, todas ellas se asocian a la acumulación de la proteína prión patológica (PrPsc) en determinadas áreas específicas del sistema nervioso central (SNC). Se caracterizan por presentar largos períodos de incubación, cursar con trastornos neurológicos progresivos con déficit cognitivo, sensorial y motor y no generar respuesta inmunitaria ni inflamatoria.

La PrPsc es una isoforma anormal de la proteína prión celular (PrPc) que en estado fisiológico se localiza principalmente en el tejido nervioso, y que al sufrir un cambio de conformación que altera su estructura terciaria y adquirir un incorrecto plegamiento se convierte en patológica. Las principales alteraciones neuropatológicas que presentan las EET son pérdida neuronal, gliosis y cambio espongiforme inducido por vacuolización del neuropilo y pericarion neuronal. El diagnóstico se realiza mediante examen histopatológico y la detección de la PrPsc mediante inmunohistoquímica o *Western Blot*, principalmente.

En este trabajo se utilizaron los modelos naturales de Scrapie ovino y de ECJ humano para determinar el papel de la glía, en concreto de las astrogliá y la microglía, en el grupo de las EET. En concreto, mediante la utilización del modelo animal se pretendía establecer su implicación en la propagación de la enfermedad a través de la valoración de los cambios producidos en relación con estas poblaciones gliales en diferentes estadios clínicos (pre-clínico, clínico y terminal) de la enfermedad. Para ello, en el estudio se incluyeron animales que se encontraban en diferentes estadios de Scrapie. También se llevó a cabo un estudio sobre muestras de tejido cerebelar humano, que habían sido diagnosticados de ECJ. En concreto, esporádico, ECJe o familiar, ECJf.

RESUMEN

Para determinar la participación de la neuroglía y describir las lesiones neuropatológicas en el tejido cerebelar humano y ovino, se aplicaron técnicas histológicas de rutina mediante tinción con hematoxilina eosina y de inmunotinción con diferentes anticuerpos específicos para la valoración mediante microscopía óptica y confocal.

Los resultados más relevantes en relación con el modelo de Scrapie consisten en que el inmunomarcaje frente a la GFAP en las muestras analizadas demostró un evidente aumento cuantitativo conforme la enfermedad avanzaba. Otra observación destacable consiste en la correspondencia del inmunomarcaje frente a la proteína GFAP con la glía de Bergmann, tanto en el estadio pre-clínico como en el terminal. Las principales observaciones histopatológicas realizadas demostraron vacuolización perineuronal e intraneuronal alrededor de las células de Purkinje, intensificándose en la fase terminal, donde a menudo se asociaba a muerte de este tipo celular. En este último estadio, también se encontró un engrosamiento de las neuritas de las células de Purkinje que habían sido descritas en la especie humana, pero no en la animal.

La implicación de la microglía en el progreso de la enfermedad no pudo confirmarse al observarse una escasa presencia de microglía reactiva independientemente del estadio clínico en el que se encontrara el animal. Sin embargo, sí que fue posible establecer una clara relación entre el comportamiento de esta microglía y el genotipo que presentaba el animal.

En el modelo humano, los estudios realizados sobre hiperplasia y/o hipertrofia astrocítica permitieron clasificar las muestras en dos patrones distintos: uno presentando una intensa inmuno-reacción en todas las capas y otro mostrando una reactividad principalmente localizada en la sustancia blanca. En ambos patrones se observó una inmunotinción coincidente con la glía de Bergmann.

Los estudios realizados utilizando la inmunohistoquímica para detectar la microglía reactiva sobre las muestras humanas permitieron la clasificación, en este caso, de tres grupos: en el primer grupo, la reactividad se observó en todas las capas del cerebelo; en el segundo

RESUMEN

grupo, la reactividad se localizaba casi exclusivamente en las capas molecular y granular; y en el tercer grupo, ésta se detectaba preferentemente en la sustancia blanca.

Respecto a las observaciones histopatológicas en las muestras de pacientes diagnosticados de ECJ evidenciaron además de vacuolización, una enorme pérdida neuronal, engrosamiento de las neuritas de las células de Purkinje, presencia de rosetas floridas en la sustancia blanca y capa granular de una muestra, así como de agregados proteicos.

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

IX. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Principales diferencias entre la PrPc y la isoforma patológica PrPsc 6

Tabla 2: Encefalopatías espongiformes transmisibles descritas en los animales..8

Tabla 3: Enfermedades priónicas humanas. En la columna de etiología, la fuente probable de infectividad se muestra entre paréntesis. (Head *et al.* 2012) 10

Tabla 4. Resumen de los parámetros utilizados para evaluación clínica (Cartier *et al.* 2012)...... 11

Tabla 5. Relación de muestras animales diagnosticadas de Scrapie natural y controles negativos sanos en función de los diferentes variables estudiadas (edad, genotipo, procedencia y estadio clínico)44

Tabla 6. Relación de las muestras humanas diagnosticadas de ECJ y de las usadas como controles negativos en función de los datos aportados por el Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid.45

X. ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Esquema de un corte transversal de cerebelo animal. NEUROANATOMIA (Puelles 2008) Editorial Panamericana.21

Fig. 2 Una visión actualizada de la plasticidad funcional de la microglía implica interacciones neuronales durante la activación microglial aguda y crónica. El disparador inicial para la activación de la microglía son señales emitidas por las neuronas dañadas o el estrés. Este aumento de las actividades microgliales, se refleja en la hipertrofia celular, representa una reacción neuroinflamatoria aguda que está diseñada para llevar a cabo la recuperación de la tensión neuronal o lesión. La muerte neuronal aguda dará lugar a la formación de los macrófagos del encéfalo: la microglía (Graeber *et al.* 2010)35

Fig. 3 Hallazgos histopatológicos observados mediante tinción con hematoxilina/eosina en cerebelos procedentes de animales control (a), pre-clínicos (b), clínicos (c) y terminales de Scrapie (d; 400x)......56

Fig. 4 Hallazgos histopatológicos observados mediante tinción con hematoxilina/eosina en cerebelos procedentes de animales en fase terminal (a) 50x (b) 200X.57

Fig. 5 Inmunohistoquímica frente a PrPsc en el cerebelo de muestras control (a), pre-clínicas (b), clínicas (c) y terminales de Scrapie (d; 50x).59

Fig. 6 Vacuolización perineuronal visualizada mediante microscopía óptica (a) y electrónica (b - c) en la capa de células de Purkinje en un caso de Scrapie terminal (400x, 4000x y 30000x, respectivamente)...... 60

Fig. 7 Hallazgos histopatológicos detectados por inmunohistoquímica frente a GFAP en el cerebelo de muestras control (a), pre-clínicas (b), clínicas (c) y terminales de Scrapie (d; 100x). 62

Fig. 8 Inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en el cerebelo de muestras clínicas de Scrapie; 200x y 400x respectivamente.63

Fig. 9 Inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en el cerebelo de muestras control (a), pre- clínicas (b), clínicas (c) y terminales de Scrapie (d; 400x).	64
Fig. 10 Diferentes patrones de reactividad de la microglía con relación al genotipo de muestras en fase terminal (200x).	65
Fig. 11 Co-localización de la microglía reactiva (a) y astrogía (b) en muestras de Scrapie en fase clínica (400x, NA-1,3)	66
Fig. 12 Hallazgos histopatológicos mediante tinción con H/E en una muestra control humana 50x (a) y 400x (b)	67
Fig. 13 Degeneración de la capa granular en una de las muestras control acompañada de pérdida neuronal masiva (a) 50x y (b) 400x.	67
Fig. 14 Vacuolización observada mediante tinción con H/E de una muestra de cerebelo de un enfermo de ECJ (a) 100x y (b) 400x.	68
Fig. 15 Patrones de distribución de la vacuolización visualizada mediante tinción H/E en muestras de cerebelo procedentes de pacientes de ECJ. Principalmente afectando a capa granular (50x, a); 200x (b) y a capa molecular (50x, c); 200x (d).	69
Fig. 16 Hallazgos histopatológicos en la capa granular de muestras humanas 50x (a) y 200x (b).	70
Fig. 17 Engrosamiento de las neuritas de las células de Purkinje evidenciadas mediante tinción con H/E (50x (a) y 400x (b).	70
Fig. 18 Rosetas floridas localizadas en sustancia blanca y capa granular de una muestra de cerebelo de un enfermo de ECJ evidenciada por tinción con H/E, 100x (a) y 630x (b).	71
Fig. 19 Agregados degenerados y/o en formación en una muestra de cerebelo procedente de un enfermo de ECJ visualizado mediante tinción con H/E, localizada en la capa de células de Purkinje (200x (a), 400x (b) y en la capa molecular (200x (c), 400x (d).	72
Fig. 20 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un control negativo (a) 100x y (b) 400x.	73
Fig. 21 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un control negativo (a) 50x y (b) 400x.	73
Fig. 22 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un paciente de ECJ (a) 50x y (b) 200x.	74
Fig. 23 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un paciente de ECJ (a) 50x y (b) 200x.	74
Fig. 24 Inmunohistoquímica frente a GFAP en una muestra de cerebelo procedente de un paciente de ECJ (a) 50x y (b) 200x.	75
Fig. 25 Imagen de rosetas floridas GFAP positivas en sustancia blanca (a) 50x y (b) 200x y en la capa granular así como en la zona próxima a las células de Purkinje (c) 200x y (d) 400x.	76
Fig. 26 Imagen obtenida mediante inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en muestras procedentes de enfermos de ECJ que presentaron diferentes patrones de distribución en todas las capas valoradas (a) 50x (b) 200x; preferentemente en la capa molecular y granular (c) 50x (d) 200x; y en la sustancia blanca (e) 50x (f) 200x.	79
Fig. 26 Imagen obtenida mediante inmunohistoquímica frente a microglía reactiva en muestras procedente de uno de los pacientes de ECJ que presentaron morfología predominantemente ameboide (a) 50x (b) 400x.	80

Fig. 28 Estudio de co-localización de la microglía reactiva (a, c, e) y astroglía (b, d, f) en muestras procedentes de pacientes de ECJ 10x (NA-03) y 20x (NA-05) Crop 2.81

BIBLIOGRAFIA

XI. BIBLIOGRAFIA

- Abbott, N., L. Rönnbäck and E. Hansson (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7(1): 41-53.
- Adams, H., E. Beck and A. M. Shenkin (1974). Creutzfeldt-Jakob disease: further similarities with kuru. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 37(2): 195-200.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36(2): 165-179.
- Aloisi, F., F. Ria and L. Adorini (2000). Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21(3): 141-147.
- Alperovitch, A., I. Zerr, M. Pocchiari, E. Mitrova, J. de Pedro Cuesta, I. Hegyi, S. Collins, H. Kretzschmar, C. van Duijn and R. G. Will (1999). Codon 129 prion protein genotype and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet* 353(9165): 1673-1674.
- Anderson, M. and N. Sims (2002). The effects of focal ischemia and reperfusion on the glutathione content of mitochondria from rat brain subregions. *J Neurochem.* 81(3): 541-549.
- Anderson, R., C. Donnelly and N. Ferguson (1996). Transmission dynamics and epidemiology of EEB in british cattle. *Nature*(382:779-88).
- Andre’oletti, O., P. Berthon, E. Levavasseur, D. Marc, F. Lantier, E. Monks, J. Elsen and F. Schelcher (2002a). Phenotyping of protein-prion (PrPsc)-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *Cell* 116: 313-327.
- Baker, C. and L. Manuelidis (2003). Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 675-679.
- Baker, C., Z. Lu, I. Zaitsev and L. Manuelidis (1999). Microglial activation varies in different models of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Virol* 73: 5089-5097.
- Baker, C. A., D. Martin and L. Manuelidis (2002). Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J Virol* 76(21): 10905-10913.
- Balazs, R., Y. Machiyama and B. Hammond (1990). The operation of the gamma-aminobutyrate bypass of the tricarboxylic acid cycle tissue in brain in vitro. *Biochem J* 116: 446-446.
- Beekes, M. and P. McBride (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamster orally infected with scrapie. *Neurosci Lett* 278 (3): 181-184.
- Begara-McGorum, I., A. M. Clark, S. Martin and M. Jeffrey (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec* 147(16): 439-441.
- Begley, D. and M. Brightman (2003). Structural and functional aspects of the blood–brain barrier *Prog Drug Res* 61: 40-78.
- Beitz JA, F. F. (2010). *Veterinary Neurobiology* CVM 6120.
- Belt, P. B. G. M., I. H. Muileman, B. E. C. Schreuder, J. Bosderuijter, A. L. J. Gielkens and M. A. Smits (1995). Identification of 5 Allelic Variants of the Sheep Prp Gene and Their Association with Natural Scrapie. *Journal of General Virology* 76: 509-517.
- Bell, J., S. Gentleman, J. Ironside, L. McCordle, P. Lantos and L. Doey (1997). Prion protein immunocytochemistry- UK five centre consensus report. *Neuropathol Appl Neurobiol* 23: 202-208.

BIBLIOGRAFIA

- Bessen, R. A. and R. F. Marsh (1994). Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy. *J Virol* 68(12): 7859-7868.
- Biber, K., H. Neumann, K. Inoue and H. W. Boddeke (2007). Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in Neurosciences* 30(11): 596-602.
- Brown, D. (1999). Neurons depend on astrocytes in a coculture system for protection from glutamate toxicity. *Mol Cell Neurosci* 13: 379-389.
- Brown, D. and J. Sassoone (2004). Role of glia in prion disease. *Mol Cell Biol* 31: 1085-1104.
- Brown, D., B. Schmidt and H. Kretzschmar (1998). A prion protein fragment primes type 1 astrocytes to proliferation signals from microglia. *Neurobiol Dis* 4: 410-422.
- Brown, D. R., B. Schmidt and H. A. Kretzschmar (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature* 380: 345-347.
- Brown, P., C. J. Gibbs and P. Rodgers-Johnson (1994). Human spongiform encephalopathy: the National Institutes of Health Series of 300 cases of experimentally transmitted disease. *Ann. Neurol* 35: 513-29.
- Brown, P., F. Cathala, R. Raubertas, D. Gajdusek and P. Castaigne (1987). Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature. *Neurology* 37: 895-904.
- Brownell, B. and D. R. Oppenheimer (1965). An Ataxic Form of Subacute Presenile Polioencephalopathy (Creutzfeldt-Jakob Disease). *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 28: 350-361.
- Bruce, E., R. Will and J. Ironside (1997). Transmissions to mice indicate that "new Variant" CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389: 498-501.
- Bueler, H., A. Aguzzi, A. Sailer, R. A. Greiner, P. Autenried, M. Aguet and C. Weissmann (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell* 73(7): 1339-1347.
- Cali, I., R. Castellani, A. Alsheklee, Y. Cohen, J. Blevins, J. Yuan, J. P. M. Langeveld, P. Parchi, J. G. Safar, W. Q. Zou and P. Gambetti (2009). Co-existence of scrapie prion protein types 1 and 2 in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease: its effect on the phenotype and prion-type characteristics. *Brain* 132: 2643-2658.
- Cartier, L. R., G. Quiroz, M. H. Leiva and C. R. Vergara (2012). [Clinical and pathologic identification of different forms of Creutzfeldt Jakob disease in Chile]. *Rev Med Chil* 140(2): 161-168.
- Collee, J. and R. Bradley (1997). EEB: a decade on part I and part II. *Lancet*(349): 715-21, 636-641).
- Collinge, J. and M. Rossor (1996). A new variant of prion disease. *Lancet* 347(9006): 916-917.
- Collins, S., V. Lewis, M. Brazier, A. Hill, V. Lawson, G. Klug and C. Masters (2005). Extended period of asymptomatic prion disease after low dose inoculation: assessment of detection methods and implications for infection control. *Neurobiol Dis* 20(2)(336-346).
- Cook, D. N., S. C. Chen, L. M. Sullivan, D. J. Manfra, M. T. Wiekowski, D. M. Prosser, G. Vassileva and S. A. Lira (2001). Generation and analysis of mice lacking the chemokine fractalkine. *Mol Cell Biol* 21(9): 3159-3165.
- Cooper, S., K. Murray and C. Heath (2006). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with cerebellar ataxia at onset in the United Kingdom *JNNP* 77: 1273-1275.
- Cotman, C., D. Monaghan, O. Ottersen and J. Strom-Mathisen (1987). Anatomical organization of excitatory amino acid receptors and their pathways *TINS* 10: 273-280.

- Dandoy-Dron, F., F. Guillo, L. Benboudjema, J. Deslys, C. Lasmezas, D. Dormont, M. Tovey and M. Dron (1998). Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J Biol Chem* 273: 7691-7697.
- Davalos, D., J. Grutzendler, G. Yang, J. V. Kim, Y. Zuo, S. Jung, D. R. Littman, M. L. Dustin and W. B. Gan (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8(6): 752-758.
- DeArmond, S., Y. Qui, H. Sanchez, P. Spilman, A. Ninchak-Casey, D. Alonso and V. Daggett (1999). PrPc glycoform heterogeneity as a function of brain region: implications for selective targeting of neurons by prion strains. *J Neuropathol Exp Neurol* 58(9): 1000-1009.
- DeArmond, S. J. and S. B. Prusiner (2003). Perspectives on prion biology, prion disease pathogenesis, and pharmacologic approaches to treatment. *Clin Lab Med* 23(1): 1-41.
- DeArmond, S. J., K. Kristensson and R. P. Bowler (1992). PrPSc causes nerve cell death and stimulates astrocyte proliferation: a paradox. *Prog. Brain Res.* 94: 437-446.
- DeArmond, S. J., W. C. Mobley, D. L. DeMott, R. A. Barry, J. H. Beckstead and S. B. Prusiner (1987). Changes in the localization of brain prion proteins during scrapie infection. *Neurology* 37(8): 1271-1280.
- DeArmond, S. J., H. Sanchez, F. Yehiely, Y. Qiu, A. Ninchak-Casey, V. Daggett, A. P. Camerino, J. Cayetano, M. Rogers, D. Groth, M. Torchia, P. Tremblay, M. R. Scott, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1997). Selective neuronal targeting in prion disease. *Neuron* 19(6): 1337-1348.
- Dehouck, M., S. Meresse, P. Delorme, J. Fruchart and R. Cecchelli (1990). An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem* 54: 1798-1801.
- Delgado-Garcia, J. M. (2001). Structure and function of the cerebellum. *Rev Neurol* 33(7): 635-642.
- Derouche, A. and Frotscher (1991). Astroglial processes around identified glutamatergic synapses contained glutamine synthetase: Evidence for transmitter degradation. *Brain Res Rev* 552: 336-350.
- Diedrich, J. F., P. E. Bendheim, Y. S. Kim, R. I. Carp and A. T. Haase (1991). Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(2): 375-379.
- Eddleston, M. and L. Mucke (1993). Molecular profile of reactive astrocytes--implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* 54(1): 15-36.
- Ejarque-Ortiz, A., J. M. Tusell, J. Serratosa and J. Saura (2007). C/EBP beta regulates gene expression in microglial activation. *Neuron Glia Biology* 2: S132-S132.
- Elkabes, S., E. DiCicco-Bloom and I. Black (1996). Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci* 16: 2508-2521.
- Eng, L. F., P. J. Reier and J. D. Houle (1987). Astrocyte activation and fibrous gliosis: glial fibrillary acidic protein immunostaining of astrocytes following intraspinal cord grafting of fetal CNS tissue. *Progress in Brain Research* <D> 71: 439-455.
- Fawcett, J. W. and R. A. Asher (1999). The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull* 49(6): 377-391.
- Fedoroff, S. and A. Vernadakis (1986). *Astrocytes*. Orlando, Academic Press.
- Fonnum, F. (1993). Regulation of the synthesis of the transmitter glutamate pool. *Prog Biophys Mol Biol* 60(1): 47-57.

- Foster, J., M. Wilson and N. Hunter (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec* 139 (21): 512-515.
- Furouka, H., M. Horiuchi, Y. Yamakawa and T. Sata (2011). Predominant involvement of the cerebellum in guinea pigs infected with Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE). *J Comp Pathol* 144: 269-276.
- Gambetti, P., P. Parchi and S. G. Chen (2003). Hereditary Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia. *Clin Lab Med* 23(1): 43-64.
- Gambetti, P., Q. Kong, W. Zou, P. Parchi and S. G. Chen (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull* 66: 213-239.
- Gao, H. M., B. Liu and J. S. Hong (2003). Critical role for microglial NADPH oxidase in rotenone-induced degeneration of dopaminergic neurons. *J Neurosci* 23(15): 6181-6187.
- García de Jalón, J., M. De las Heras and L. Balaguer (1987). Enfermedad del prurigo lumbar (scrapie) en la oveja: diagnóstico en 5 rebaños. *Medicina Veterinaria* 4: 303-312.
- Gardner, D. and D. Shoback (2007). Greenspan's basic and clinical endocrinology 8th edition.
- Garrido, J. and H. Diaz (2009). Mechanisms involved in axon formation, axonal elongation and protein targeting at the axon
Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia, Monografía XXV: Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas: 19-48.
- Ghez, C. and W. Thach (2000). The cerebellum. In Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM eds *Principles of neural science*. Elsevier: 832-854.
- Giese, A., D. R. Brown, M. H. Groschup, C. Feldmann, I. Haist and H. A. Kretzschmar (1998). Role of microglia in neuronal cell death in prion disease. *Brain Pathol.* 8: 449-457.
- Glatzel, M. and A. Aguzzi (2000). Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect* 2(6): 613-619.
- Goldfarb, L. G., P. Brown, L. Cervenakova and D. C. Gajdusek (1994). Genetic analysis of Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 343(1306): 379-384.
- Gomes-Leal, W. (2012). Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders? *Brain Behav* 2(3): 345-356.
- Gomori, A. J., M. J. Partnow, D. S. Horoupian and A. Hirano (1973). The ataxic form of Creutzfeldt-Jakob disease. *Arch Neurol* 29(5): 318-323.
- Gonzalez, L., S. Martin and M. Jeffrey (2003). Distinct profiles of Prp (d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE -infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol* 84 (pt 5): 1339-1350.
- Graeber, M. B. and W. J. Streit (2010). Microglia: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119(1): 89-105.
- Gutiérrez, A. R. and C. G. Márquez (2006). Nuevos criterios en el diagnóstico histológico de las Demencias.
- Hadlow, W. J., R. C. Kennedy and R. E. Race (1982). Natural infection of Suffolk sheep with scrapie virus. *J Infect Dis* 146(5): 657-664.
- Hafiz, F. and D. Brown (2000). A Model for the Mechanism of Astrogliosis in Prion Disease. *Molecular and Cellular Neuroscience* 16: 221-232.
- Haller, M. F. and W. M. Saltzman (1998). Localized delivery of proteins in the brain: can transport be customized? *Pharm Res* 15(3): 377-385.
- Halliwell, B. (1992). Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59(5): 1609-1623.

- Hanisch, U. K. and H. Kettenmann (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10(11): 1387-1394.
- Hardt, M., T. Baron and M. H. Groschup (2000). A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 122(1): 43-53.
- Haritani, M., Y. I. Spencer and G. A. Wells (1994). Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol* 87(1): 86-90.
- Harris, D., M. Huber, P. Van Dijken, S. Shyng, B. Chait and R. Wang (1993). Processing of cellular Prion Protein: Identification of N- and C-Terminal Cleavage Sites. *Biochemistry* 32: 1009-1016.
- Hawkins, B. and T. Davis (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* 57(2): 173-185.
- Haydon, P. G. (2001). GLIA: listening and talking to the synapse. *Nat Rev Neurosci* 2(3): 185-193.
- Head, M., D. Ritchie and N. Smith (2004). Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative and biochemical study. *Am J Pathol* 164: 143-153.
- Head, M. W. and J. W. Ironside (2012). Review: Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein type, disease phenotype and agent strain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 38(4): 296-310.
- Heggebo, R., C. M. Press, G. Gunnes, M. J. Ulvund, M. A. Tranulis and T. Lsverk (2003). Detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *J Comp Pathol* 128(2-3): 172-181.
- Heppner, F. L., M. Greter, D. Marino, J. Falsig, G. Raivich, N. Hovelmeyer, A. Waisman, T. Rulicke, M. Prinz, J. Priller, B. Becher and A. Aguzzi (2005). Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 11(2): 146-152.
- Hourrigan, J. and A. Klingsporn (1996). Scrapie: studies on vertical and horizontal transmission. In: Gibbs CJ JR, ed *Bovine spongiform encephalopathy: the EEB dilemma*. Springer: 59-83.
- Hughes, P., M. Botham, S. Frentzel, A. Mir and V. Perry (2002). Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* 37: 314-327.
- Iadecola, C. (2004). Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5(5): 347-360.
- Iadecola, C. (2010). The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathol* 120(3): 287-296.
- Ironside, J. W. (1996). Human prion diseases. *J Neural Transm Suppl* 47: 231-246.
- Ironside, J. W., D. L. Ritchie and M. W. Head (2005). Phenotypic variability in human prion diseases. *Neuropathol Appl Neurobiol* 31(6): 565-579.
- Ironside, J. W., M. W. Head, L. McCardle and R. Knight (2002). Neuropathology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 62(3): 175-182.
- Jeffrey, M., C. Goodsir, A. Holliman, R. Higgins, M. Bruce and P. McBride (1998). Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec* 142 (20): 534-537.
- Jeffrey, M., I. Begara-McGorum, S. Clark, S. Martin, J. Clark and M. Chaplin (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J. Comp Pathol* 127: 264-273.

- Jellinger, K., W. D. Heiss and E. Deisenhammer (1974). The ataxic (cerebellar) form of Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 207(4): 289-305.
- Jendroska, K., F. P. Heinzl, M. Torchia, L. Stowring, H. A. Kretzschmar, A. Kon, A. Stern, S. B. Prusiner and S. J. Dearmond (1991). Proteinase-Resistant Prion Protein Accumulation in Syrian-Hamster Brain Correlates with Regional Pathology and Scrapie Infectivity. *Neurology* 41(9): 1482-1490.
- John, G., S. Lee and C. Brosnan (2003). Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist* 9: 10-22.
- Kalman, M. and F. Hajos (1989). Distribution of glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactive astrocytes in the rat brain *Expl Brain Res* 78: 147-163.
- Kettenmann, H., U. K. Hanisch, M. Noda and A. Verkhratsky (2011). Physiology of microglia. *Physiol Rev* 91(2): 461-553.
- Kittelberger, R., M. J. Chaplin, M. M. Simmons, A. Ramirez-Villaescusa, L. McIntyre, S. C. MacDiarmid, M. J. Hannah, J. Jenner, R. Bueno, D. Bayliss, H. Black, C. J. Pigott and J. S. O'Keefe (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J Vet Diagn Invest* 22(6): 863-875.
- Knigh, R. and R. Will (2004). Prion diseases. *JNNP* 75: i36-i42.
- Kovacs, G., G. Trabattoni, J. Hainfellner, J. Ironside, R. Knigh and H. Budka (2002). Mutations of the prion protein gen: phenotypic spectrum. *J. Neurol.* 249: 1156-1182.
- Kretzschmar, H. A. (1993). Human prion diseases (spongiform encephalopathies). *Arch. Virol* 7:261-93.
- Kretzschmar, H. A., S. B. Prusiner, L. E. Stowring and S. J. DeArmond (1986). Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol* 122(1): 1-5.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Principles of neuronal regeneration. *Acta Neurochir Suppl* 66: 103-106.
- Kreutzberg, G. W. (1996). Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends in Neurosciences* 19(8): 312-318.
- Kubler, E., B. Oesch and A. J. Raeber (2003). Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull* 66: 267-279.
- Lampert, P. W., D. C. Gajdusek and C. J. Gibbs, Jr. (1972). Subacute spongiform virus encephalopathies. Scrapie, Kuru and Creutzfeldt-Jakob disease: a review. *Am J Pathol* 68(3): 626-652.
- Landty, C., G. Ivy and I. Brown (1990). Developmental expression of glial fibrillary acidic protein mRNA in the rat brain analyzed by in situ hybridization. *J Neurosci Res* 25: 194-203.
- Langmann, T. (2007). Microglia activation in retinal degeneration. *J Leukoc Biol* 81(6): 1345-1351.
- Lawson, L., V. Perry and S. Gordon (1992). Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 98: 405-415.
- Lee, H., Y. Jun, J. Choi, J. Kim, R. Carp and Y. Kim (2005). The expression of RANTES and chemokine receptors in the brains of scrapie-infected mice. *J Neuroimmunol* 158: 26-33.
- Lehrmann, E., T. Christensen, J. Zimmer, N. H. Diemer and B. Finsen (1997). Microglial and macrophage reactions mark progressive changes and define the penumbra in the rat neocortex and striatum after transient middle cerebral artery occlusion. *Journal of Comparative Neurology* 386(3): 461-476.
- Lindsay, R. (1986). Reactive gliosis in Astrocytes and pathology of astrocytes. *Cell Biology* 3: 231-365.

BIBLIOGRAFIA

- Liu, B. and J. S. Hong (2003). Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention. *J Pharmacol Exp Ther* 304(1): 1-7.
- Lugaresi, E., R. Medori, P. Montagna, A. Baruzzi, P. Cortelli, A. Lugaresi, P. Tinuper, M. Zucconi and P. Gambetti (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med* 315(16): 997-1003.
- Llinas, R. and K. Walton (1990). *The synaptic organization of the brain* Oxford University press: 24-245.
- Mabbott, N. and M. Bruce (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J. Gen Virol* 82(Pt 10): 2307-2318.
- Malhotra, S. K., T. K. Shnitka and J. Elbrink (1990). Reactive astrocytes--a review. *Cytobios* 61(246-247): 133-160.
- Manson, J., J. D. West, V. Thomson, P. McBride, M. H. Kaufman and J. Hope (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development* 115(1): 117-122.
- Manuelidis, L., W. Fritch and Y. G. Xi (1997). Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science* 277(5322): 94-98.
- Manuelidis, L., D. M. Tesin, T. Sklaviadis and E. E. Manuelidis (1987). Astrocyte gene expression in Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(16): 5937-5941.
- Marella, M. and J. Chabry (2004). Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci* 24: 620-627.
- Martinez, C. (2000). *Astrocitosis y activacion de microglia mediada por oxido nitrico sintasa en la Neuroexcitocidad por glutamato*, Universidad de Colima Mexico.
- Martins, V., R. Liden, M. Prado, R. Walz, A. Sakamoto, I. Izquierdo and R. Brentani (2002). Cellular prion protein: on the road for functions. *FEBS Lett* 512 (1-3): 25-28.
- Mastrianni, J. A., R. Nixon, R. Layzer, G. C. Telling, D. Han, S. J. DeArmond and S. B. Prusiner (1999). Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia. *N Engl J Med* 340(21): 1630-1638.
- Mathews, K. Christopher, K. Van Holde, Ahern and G. Kevin (2002). *Bioquímica*.
- McGraw, J., G. W. Hiebert and J. D. Steeves (2001). Modulating astrogliosis after neurotrauma. *J Neurosci Res* 63(2): 109-115.
- Medori, R., H. Tritschler, A. Le Blanc Le Blanc and F. Villare (1992). Fatal familial insomnia, a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion protein gene. *N. Engl. J. Med* 326: 444-49.
- Miller, J., A. Jenny, W. Taylor, R. Marsh, R. Rubenstein and R. Race (1993). Immunohistochemical detection of prion protein protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* 5: 309-316.
- Morioka, T., A. N. Kalehua and W. J. Streit (1993). Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain. *Journal of Comparative Neurology* 327(1): 123-132.
- Moser, M., R. Colello, U. Pott and B. Oesch (1995). Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron* 14: 509-517.
- Mott, R., G. Ait-Ghezala, T. Town, T. Mori, M. Vendrame and J. Zeng (2004). Neuronal expression of CD22: novel mechanism for inhibiting microglial proinflammatory cytokine production. *Glia* 46: 369-379.
- Mucke, L. and M. Eddleston (1993). Astrocytes in infectious and immune-mediated diseases of the central nervous system. *FASEB J* 7(13): 1226-1232.

- Muhleisen, H., J. Gehrmann and R. Meyermann (1995). Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 21(6): 505-517.
- Nedergaard, M., B. Ransom and S. A. Goldman (2003). New roles for astrocytes: Redefining the functional architecture of the brain. *Trends in Neurosciences* 26(10): 523-530.
- Netter, F. (2003). atlas de anatomia humana Masson 3^a edicion Barcelona.
- Newman, E. (2003). Glial cell inhibition of neurons by release of ATP. *J neurosci* 23: 1659-1666.
- Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff and F. Helmchen (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308(5726): 1314-1318.
- Norenberg, N. and A. Martinez (1979). Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Res Rev* 169: 303-310.
- Norton, W., D. Aquino, I. Hozumi, F. Chiu and C. Brosnan (1992). Quantitative aspects of reactive gliosis: a review. *Neurochem Res* 17: 877-885.
- Notari, S., S. Capellari, A. Giese, I. Westner, A. Baruzzi, B. Ghetti, P. Gambetti, H. A. Kretzschmar and P. Parchi (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.
- Ogura, K., M. Ogawa and M. Yoshida (1994). Effects of ageing on microglia in the normal rat brain: immunohistochemical observations. *Neuroreport* 5(10): 1224-1226.
- OIE (2008). Manual of Standards for Diagnostic Test ad Vaccines, 4^a ed. Paris.
- Oswald, M., D. Palmer, G. Kay, S. Shemilt, P. Rezaie and J. Cooper (2005). Glial activation spreads from specific cerebral foci and precedes neurodegeneration in presymptomatic ovine neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6). *Neurobio Dis* 20: 49-63.
- Oswald, M. J., D. N. Palmer, G. W. Kay, S. J. Shemilt, P. Rezaie and J. D. Cooper (2005). Glial activation spreads from specific cerebral foci and precedes neurodegeneration in presymptomatic ovine neuronal ceroid lipofuscinosis (CLN6). *Neurobiol Dis* 20(1): 49-63.
- Parchi, P., R. Castellani, S. Capellari, B. Ghetti, K. Young, S. G. Chen, M. Farlow, D. W. Dickson, A. A. Sima, J. Q. Trojanowski, R. B. Petersen and P. Gambetti (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 39(6): 767-778.
- Parchi, P., R. Strammiello, S. Notari, A. Giese, J. P. Langeveld, A. Ladogana, I. Zerr, F. Roncaroli, P. Cras, B. Ghetti, M. Pocchiari, H. Kretzschmar and S. Capellari (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.
- Parchi, P., A. Giese, S. Capellari, P. Brown, W. Schulz-Schaeffer, O. Windl, I. Zerr, H. Budka, N. Kopp, P. Piccardo, S. Poser, A. Rojiani, N. Streichemberger, J. Julien, C. Vital, B. Ghetti, P. Gambetti and H. A. Kretzschmar (1999). Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol* 46: 224-233.
- Perez-Capote, K., J. Saura, J. Serratos and C. Sola (2006). Expression of C/EBPalpha and C/EBPbeta in glial cells in vitro after inducing glial activation by different stimuli. *Neurosci Lett* 410: 25-30.
- Perry, V. H., M. K. Matyszak and S. Fearn (1993). Altered antigen expression of microglia in the aged rodent CNS. *Glia* 7(1): 60-67.

- Peters, A., K. Josephson and S. Vincent (1991). Effects of aging on the neuroglial cells and pericytes within area 17 of the Rhesus Monkey cerebral cortex. *Anat Rec* 229: 284-298.
- Pinel, G., E. Montero, G. Morlan, M. Martinez, B. Aladro, R. Mendoza, J. Pedro-Cuesta and M. Calero (2011). Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética fulminante asociada a mutación E200K y polimorfismo M129V. *Neurol Arg* 3(4): 210-213.
- Pocchiari, M., M. Puopolo, E. A. Croes, H. Budka, E. Gelpi, S. Collins, V. Lewis, T. Sutcliffe, A. Guilivi, N. Delasnerie-Laupretre, J. P. Brandel, A. Alperovitch, I. Zerr, S. Poser, H. A. Kretzschmar, A. Ladogana, I. Rietvald, E. Mitrova, P. Martinez-Martin, J. de Pedro-Cuesta, M. Glatzel, A. Aguzzi, S. Cooper, J. Mackenzie, C. M. van Duijn and R. G. Will (2004). Predictors of survival in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and other human transmissible spongiform encephalopathies. *Brain* 127(Pt 10): 2348-2359.
- Ponz, R., L. V. Monteagudo and M. V. Arruga (2002). Identificación de la resistencia o sensibilidad al Scrapie ovino. *Albeitar* 52: 36-38.
- Press, C. M., R. Heggebo and A. Espenes (2004). Involvement of gut-associated lymphoid tissue of ruminants in the spread of transmissible spongiform encephalopathies. *Adv Drug Deliv Rev* 56(6): 885-899.
- Priller, J., M. Prinz, M. Heikenwalder, N. Zeller, P. Schwarz, F. Heppner and A. Aguzzi (2006). Early and Rapid Engraftment of Bone Marrow-Derived Microglia in Scrapie. *The Journal of Neuroscience*, 26(45): 11753-11762.
- Prusiner, S., D. Bolton, D. Groth, K. Bowman, S. Cochran and M. McKinley (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry* 21(26): 6942-6950.
- Prusiner, S. B. (1997). Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 278(5336): 245-251.
- Prusiner, S. B. (1998). The prion diseases. *Brain Pathol* 8(3): 499-513.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(23): 13363-13383.
- Rabano, A., J. de Pedro-Cuesta, K. Molbak, A. Siden, M. Calero and H. Laursen (2005). Tissue classification for the epidemiological assessment of surgical transmission of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. A proposal on hypothetical risk levels. *BMC Public Health* 5: 9.
- Ransohoff, R. M. and V. H. Perry (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27: 119-145.
- Rapoport, M., R. van Reekum and H. Mayberg (2000). The role of the cerebellum in cognition and behavior: a selective review. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 12(2): 193-198.
- Rezaie, P. and P. Lantos (2001). Microglia and the pathogenesis of spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev* 35(1): 55-72.
- Richardson, E. and C. Masters (1995). The nosology of creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of Pr^{PeCJ} in the nervous system. *brain Pathology*(5:33-4).
- Rodriguez, F. (2007). *Vias de Señalización en Enfermedades Prionicas*, Universidad de Barcelona.
- Rodriguez, J. and A. Verkhratsky (2011). Neuroglial roots of neurodegenerative diseases? *Mol Neurobiol* 43: 87-96.
- Rolls, A., R. Shechter and M. Schwartz (2009). The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nature Neuroscience* 10: 235-241.
- Roucou, X., M. Gains and A. C. LeBlanc (2004). Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res* 75(2): 153-161.

- Rubin, L. and J. Staddon (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* 22: 11-28.
- Ryder, S. J., Y. I. Spencer, P. J. Bellerby and S. A. March (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Veterinary Record* 148(1): 7-+.
- Safar, J., H. Wille, V. Itri, D. Groth, H. Serban, M. Torchia, F. E. Cohen and S. B. Prusiner (1998). Eight prion strains have PrP(Sc) molecules with different conformations. *Nat Med* 4(10): 1157-1165.
- Sakaguchi, S., S. Katamine, N. Nishida, R. Moriuchi, K. Shigematsu, T. Sugimoto, A. Nakatani, Y. Kataoka, T. Houtani, S. Shirabe, H. Okada, S. Hasegawa, T. Miyamoto and Noda (1996). Loss of cerebellar Purkinje cells in aged mice homozygous for a disrupted PrP gene. *Nature* 380(6574): 528-531.
- Sarasa, R., A. Martínez, E. Monleón, R. Bolea, A. Vargas, J. Badiola and M. Monzón (2012). The involvement of astroglia in the pathogenesis of transmissible spongiform encephalopathies: A confocal microscopy study. *Cell Tissue Res* 350(1): 127-134.
- Sarna, J. R. and R. Hawkes (2003). Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol* 70(6): 473-507.
- Sasaki, A., J. Hirato and Y. Nakazato (1993). Immunohistochemical study of microglia in the Creutzfeldt–Jacob diseased brain. *Acta Neuropathol* 86: 337-344.
- Schmahmann, J. (2004). Disorders of the cerebellum: ataxia, dysmetria of thought and the cerebellar cognitive affective syndrome. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 16(367-378).
- Schwab, J. M., E. Frei, I. Klusman, L. Schnell, M. E. Schwab and H. J. Schluesener (2001). AIF-1 expression defines a proliferating and alert microglial/macrophage phenotype following spinal cord injury in rats. *J Neuroimmunol* 119(2): 214-222.
- Schwartz, M. (2003). *How the cows turned mad*. university the california press: 238.
- Shaked, G. M., Z. Meiner, I. Avraham, A. Taraboulos and R. Gabizon (2001). Reconstitution of prion infectivity from solubilized protease-resistant PrP and nonprotein components of prion rods. *J Biol Chem* 276(17): 14324-14328.
- Sheppard, C. (1993). *Confocal Microscopy - Principles, Practice and Options* Fluorescent and Luminiscent Probes for Biological Activity. Academic Press.
- Shimizu, S., T. Hoshi and M. Homma (1999). Creutzfeldt-Jakob disease with florid-type plaques after cadaveric duramater grafting. *Arch Neurol* 56: 357-363.
- Sikorska, B., R. Knight, J. W. Ironside and P. P. Liberski (2012). Creutzfeldt-Jakob disease. *Adv Exp Med Biol* 724: 76-90.
- Simard, A. R., D. Soulet, G. Gowing, J. P. Julien and S. Rivest (2006). Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron* 49(4): 489-502.
- Spencer, M., R. Knight and R. Will (2002). First hundred cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease: retrospective case note review of early psychiatric and neurological features. *BMJ* 324: 1479-1482.
- Stamp, J. (1962). Scrapie: a transmissible disease of sheep. *Vet Rec* 74: 357-362.
- Stern, K. (1939). Severe dementia associated with bilateral symmetrical degeneration of the thalamus. *Brain* 62:157-71.
- Streit, W. (1996). The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicol* 17: 671-678.
- Streit, W. (2002). Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40: 133-139.
- Streit, W., M. Graeber and G. Kreutzberg (1998). Functional plasticity of microglia: A review. *Glia* 1: 301-307.

- Streit, W., S. Walter and N. Pennell (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol* 57: 563-581.
- Sugama, S., M. Fujita, M. Hashimoto and B. Conti (2007). Stress induced morphological microglial activation in the rodent brain: involvement of interleukin-18. *Neuroscience* 146(3): 1388-1399.
- Thach, W., H. Goodkin and J. Keating (1992). The cerebellum and the adaptive coordination of movement. *Ann Rev Neurosci* 15: 403-442.
- Thored, P., U. Heldmann, W. Gomes-Leal, R. Gisler, V. Darsalia, J. Taneera, J. M. Nygren, S. E. Jacobsen, C. T. Ekdahl, Z. Kokaia and O. Lindvall (2009). Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia* 57(8): 835-849.
- v Eitzen, U., R. Egensperger, S. Kosel, E. M. Grasbon-Frodl, Y. Imai, K. Bise, S. Kohsaka, P. Mehraein and M. B. Graeber (1998). Microglia and the development of spongiform change in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(3): 246-256.
- Van Everbroeck, B., E. Dewulf, P. Pals, U. Lubke, J. J. Martin and P. Cras (2002). The role of cytokines, astrocytes, microglia and apoptosis in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Aging* 23(1): 59-64.
- Van Keulen, L., M. Vromans and F. Van Zijderveld (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS* 110: 23-32.
- Volterra, A. and J. Meldolesi (2005). Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 6(8): 626-640.
- Ward, H., D. Everington and S. Cousens (2006). Risk factors for variant Creutzfeldt-Jakob disease: a case-control study. *Ann Neurol* 59: 111-120.
- Wells, G. and J. Wilesmith (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol* 5(1): 91-103.
- Wells, G., S. Hawkins, R. Green, A. Austin, I. Dexter and Y. Spencer (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE) up date. *Vet Rec* 142 (5) 103-106.
- Wilson, T. (1990). *Confocal microscopy*. Academic Press.
- William, A., S. Ryder and W. Blakemore (1995). Monocyte recruitment into the scrapie-affected brain. *Acta Neuropathol* 90: 164-169.
- Williams, A., L. Lawson, V. Perry and H. Fraser (1994). Characterisation of the microglial response in murine scrapie *Neuropathol Appl Neurobiol* 20: 47-55.
- Williams, A., P. Lucassen, D. Ritchie and M. Bruce (1997). PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol* 144: 433-438.
- Wolburg, H. and A. Lippoldt (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier Development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* 38(6): 323-337.
- Woodroffe, M. N. and M. L. Cuzner (1993). Cytokine mRNA expression in inflammatory multiple sclerosis lesions: detection by non-radioactive in situ hybridization. *Cytokine* 5(6): 583-588.
- Yamada, K. and M. Watanabe (2002). Cyto-differentiation of Bergmann glia and its relationship with Purkinje cells. *Anat Sci Int* 77: 94-108.
- Yoshida, K. and F. Gage (1991). Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes. *Brain Res Rev* 538: 118-126.
- Zhou, Y., Y. Wang, M. Kovacs, J. Jin and J. Zhang (2005). Microglial activation induced by neurodegeneration: a proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* 4(10): 1471-1479.

BIBLIOGRAFIA

Zlokovic, B. (2005). Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci* 28(4): 202-208.