



**Universidad
Zaragoza**

Trabajo Fin de Grado

**POSIBLE RELACIÓN DE LA DESREGULACIÓN DEL METABOLISMO
LIPÍDICO CON LA NEUROINFLAMACIÓN DE LAS ENFERMEDADES
PRIÓNICAS Y PRION-LIKE**

*POSSIBLE RELATIONSHIP BETWEEN DISREGULATION OF LIPID
METABOLISM IN PRION AND PRION-LIKE DISEASES*

Autora

Irene Montón Blasco

Directora

Marta Monzón Garcés

Facultad de Medicina

Departamento de Histología

Curso: 2022-2023

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1 ¿QUÉ ES LA NEURODEGENERACIÓN?.....	4
1.2 ASOCIACIÓN DE NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN	4
1.3 TIPOS DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS	6
1.3.1 ALZHEIMER (EA)	6
1.3.2 PARKINSON (EP)	7
1.3.3 DEMENCIA FRONTOTEMPORAL (DFT).....	7
1.3.4 CREUTZFELDT-JAKOB (ECJ)	8
1.3.5 ATAXIA DE FRIEDERICH (AF)	8
1.3.6 ENFERMEDAD DE LA MOTONEURONA (EMN)	9
1.3.7 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH).....	9
1.3.8 PRIONOPATÍA VARIABLE SENSIBLE A PROTEASAS (PrVSP).....	10
1.4 ALTERACIONES LIPÍDICAS Y NEURODEGENERACIÓN	10
1.5 HISTOLOGÍA DEL CEREBELO	12
1.5.1 CAPAS DE LA CORTEZA DEL CEREBELO (36)	12
1.5.2 CONEXIONES CEREBELOSAS	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS	14
4. RESULTADOS.....	16
5. DISCUSIÓN	22
6. CONCLUSIONES	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

RESUMEN

Recientes estudios sobre la Enfermedad de Alzheimer (EA) apuntan a la desregulación del metabolismo lipídico como una de las bases moleculares de su patogenia. Esta hipótesis se basa esencialmente en la implicación demostrada del gen ApoE4 como principal factor de riesgo genético para el padecimiento de esta demencia, que se asocia con una cascada de acontecimientos protagonizados por una ruptura de la homeostasis, principalmente de los ácidos grasos, dentro del SNC. El objetivo de este trabajo ha sido demostrar si, en las demás enfermedades neurodegenerativas que comparten rasgos neuropatológicos comunes con la EA, también existen alteraciones en los patrones de distribución de los depósitos lipídicos, aplicando una tinción fluorescente específica frente a lípidos (*LipidTox*). Los hallazgos descritos en este trabajo confirman por primera vez esta relación, abordando la fisiopatología de la neurodegeneración desde una perspectiva novedosa, y apoyando de nuevo el protagonismo de las células gliales reactivas en el proceso de neurodegeneración.

Palabras clave: neurodegeneración, neuroinflamación, metabolismo lipídico, Enfermedad de Alzheimer, depósito lipídico, enfermedades priónicas y prion-like

ABSTRACT

Recent studies concerning Alzheimer's Disease (AD) suggest the disruption of lipid metabolism as a pivotal molecular underpinning within its pathogenesis. This hypothesis derives its essence from the discernible involvement of the ApoE4 gene as the preeminent genetic risk factor associated with this debilitating form of dementia, intimately linked to a cascade of events precipitating the disturbance of homeostasis, particularly pertaining to fatty acids, within the central nervous system (CNS). The primary aim of this study has been to ascertain whether other neurodegenerative diseases, sharing neuropathological features with AD, evidence concomitant alterations in the distribution patterns of lipid deposits. A fluorescent staining technique targeting the lipid deposits (LipidTox) was applied with this purpose. The conclusions drawn here confirm for first time this relationship, thus engaging in a novel paradigm for comprehending the physiopathology underlying neurodegeneration, whilst supporting the significance of reactive glial cells in the inexorable neurodegenerative process.

Key words: neurodegeneration, neuroinflammation, lipid metabolism, Alzheimer´s disease, lipid deposit, prion and prion-like diseases

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ¿QUÉ ES LA NEURODEGENERACIÓN?

La neurodegeneración es un proceso que tiene lugar en el sistema nervioso central (SNC) caracterizado por la pérdida y disfunción neuronal. Este tipo de enfermedades son progresivas, provocando una degeneración que se extiende a prácticamente la totalidad del tejido nervioso en el transcurso de la enfermedad y que tiene un curso irreversible. Han recibido diferentes clasificaciones atendiendo tanto a la distribución anatómica de la neurodegeneración (frontotemporal, trastornos extrapiramidales...), los principales signos clínicos que la caracterizan (demencia, parkinsonismo...) o la proteína a la que se asocia (sinucleinopatía, taupatía...) (1).

Algunas de las enfermedades neurodegenerativas mayormente conocidas son la enfermedad de Alzheimer (EA), la de Parkinson (EP) o la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA). Todas estas enfermedades han sido asociadas con la edad, dado que su prevalencia aumenta en países donde la población está más envejecida. Ante la inexistencia de tratamiento, es importante encontrar asociaciones moleculares que nos ayuden a diagnosticarlas y prever su progresión de una manera temprana.

En la neuropatología de todas estas enfermedades ha sido descrita la acumulación de alguna proteína con un plegamiento anómalo. Un ejemplo muy estudiado de ello es la EA, donde acúmulos de β -amiloide y/o proteína tau han sido observados en las muestras estudiadas. Se cree que la presencia de estas proteínas patológicas genera en la célula nerviosa un estrés que desencadena eventos citotóxicos, disfunción sináptica, neuroinflamación, daño en el DNA, disfunción mitocondrial... lo cual la lleva a entrar en un proceso de muerte neuronal mediada en su mayor medida por apoptosis o necrosis.

La apoptosis puede ser activada por ligandos extracelulares o señales intracelulares tales como la detección de daño en el DNA o la activación de p53, que desencadenan una alteración en la permeabilidad de la membrana mitocondrial iniciando la cascada apoptótica. La consecución de esta vía lleva a la creación de cuerpos apoptóticos en los que residen parte del contenido celular degradado, y que posteriormente serán fagocitados por células de la microglía.

En el caso de la necrosis, el contenido intracelular sale al exterior tras la pérdida de la integridad de la membrana pudiendo activar mediadores inflamatorios a este nivel, principal diferencia con la apoptosis (2).

1.2 ASOCIACIÓN DE NEUROINFLAMACIÓN Y NEURODEGENERACIÓN

La neurodegeneración y los cambios que en ella se producen están cobrando una gran importancia en el campo de la investigación en los últimos años debido al gran aumento en la prevalencia de este tipo de enfermedades en relación con el envejecimiento de la población.

Algunos de los cambios que se han observado conjuntamente en estas enfermedades tienen que ver con la disfunción mitocondrial, el daño en el ADN, el aumento del estrés oxidativo o la neuroinflamación. En relación con esta última, constituyendo la hipótesis más aceptada sobre la posible causante de todas estas patologías neurodegenerativas, postula que estos cambios en morfología y función que tienen lugar en el tejido nervioso llevan

a la activación del sistema inmune que allí se alberga. Las células que tienen esta función en el SNC son las células gliales, entre las que se incluyen los astrocitos y microglía. La función fisiológica de la microglía es el mantenimiento de la homeostasis del tejido nervioso, fagocitando las células apoptóticas, microorganismos o restos celulares, remodelando las uniones nerviosas, interpretando señales que les llegan del medio extracelular, participando en el buen funcionamiento de la barrera hematoencefálica (BHE) o participando directamente en la sinapsis junto con astrocitos y neuronas. De esta forma, representan la primera línea de defensa dentro del SNC, por lo que tiene sentido que se encuentren activadas en patologías donde existe una disrupción en el funcionamiento neuronal, basada fundamentalmente en el depósito de una proteína patógena (3).

Según una de las hipótesis recientes, la activación microglial lleva a su diferenciación en dos fenotipos con funcionalidades diferentes: neuroprotector (M2) y neurotóxico (M1). Por lo general, en el transcurso de las enfermedades neurodegenerativas las células de la neuroglía pierden su función neuroprotectora y aumentan su faceta neurotóxica, cambiando de igual modo la expresión de moléculas proinflamatorias e inmunorreguladoras como el IL1 β , TNF α , IL-6 u óxido nítrico. Este cambio fenotípico al neurotóxico también se ha visto relacionado con algunas enfermedades sistémicas como la obesidad, la resistencia a la insulina o la Diabetes Mellitus tipo II (DM2), las que a su vez son consideradas como factores de riesgo que precipitan la neurodegeneración (4).

Cabe mencionar por separado el papel del astrocito en el mantenimiento de la homeostasis dentro del tejido nervioso, siendo responsable de mantener la barrera hematoencefálica, sirviendo de soporte energético a las neuronas, regulando el equilibrio extracelular, eliminando células muertas, participando en la neurogénesis y actuando como sostén mecánico definiendo las capas que conforman el SNC (3). Su activación en las diferentes enfermedades neurodegenerativas, debido probablemente a estímulos inflamatorios, lleva consigo un cambio morfológico y funcional, que implica variaciones en la expresión de diversos receptores de membrana. Uno de los más estudiados en los últimos años es la apolipoproteína E (ApoE), por la relación de una de sus isoformas, E4, no sólo con una acumulación lipídica en el SNC en los pacientes con EA, sino también con una mayor velocidad de propagación dentro de las taupatías, promoviendo la gliosis (cambios hipertróficos y/o hiperplásicos de las células gliales), pérdida de la oligodendroglía y neurotoxicidad astrocitaria (5)(6). Un esquema de las vías por las que el astrocito puede ser activado lo encontramos en la **Figura 1**.

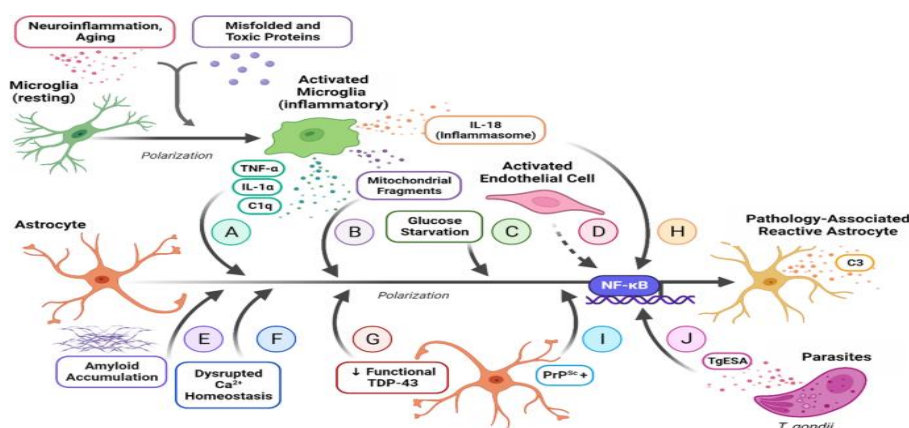


Figura 1. Mecanismos de inducción de la polarización del astrocito reactivo en relación con la microglía (7)

Así, la neuroinflamación como mecanismo central en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas consiste en una compleja red de procesos interrelacionados en los que los astrocitos y las células microgliales juegan papeles esenciales. Se piensa que una activación desregulada podría provocar una reacción inflamatoria anormal que lidera la muerte neuronal finalmente. La perturbación en el *crosstalk* entre microglía, astrocitos y neuronas causa neurotoxicidad y deterioro cognitivo (8). Recientes estudios describen la presencia de estados reactivos de estas estirpes celulares en las patologías neurodegenerativas relacionando estos cambios con la pérdida de su función protectora y reparadora. El fallo en la labor fagocítica de neuronas dañadas y proteínas incorrectamente plegadas que tiene de manera inherente la microglía, junto con el deterioro de la función homeostática de los astrocitos, agravan el proceso inflamatorio iniciado, exacerbando la neurodegeneración (9).

De hecho, se ha demostrado que el depósito de α -sinucleína en el caso de la EP o del β -amiloide en el caso de la EA, promueven la activación inmune de estos subtipos celulares creando un ambiente proinflamatorio que lleva al daño y muerte neuronal, proceso en el que se desemboca siempre la neurodegeneración. Para sustentar esta teoría, hay estudios en los que se han creado ratones *knock-out* en los principales genes de las moléculas proinflamatorias que determinan el cambio fenotípico astrocitario a su forma tóxica: IL α , TNF α y C1q afectados de ELA. A través de este silenciamiento, se consiguió frenar la progresión del deterioro motor y prolongar la esperanza de vida en más de un 50%, lo que demuestra el papel fundamental de la población glial en el proceso de muerte neuronal (10).

1.3 TIPOS DE ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

En este trabajo estudiaremos muestras de cerebelo de las enfermedades descritas en este punto, por lo que se ha intentado hacer hincapié en los cambios que hasta ahora se han descrito a nivel histopatológico en esta área anatómica encefálica.

1.3.1 ALZHEIMER (EA)

Es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente que inicia con una clínica típica de pérdida de memoria y dificultades para el aprendizaje de conceptos nuevos. Aunque los síntomas iniciales sean éstos, tiene un curso progresivo en el que se acaban afectando otras funciones superiores como la atención, las gnosias, la praxis, la personalidad y el comportamiento social. Se han identificado diferentes variantes que pueden empezar con síntomas menos frecuentes al inicio como la logopénica, en la que destaca la clínica de afasia. Para la valoración del estadio y la gravedad de la demencia se han elaborado escalas como la *Clinical Dementia Rating* (CDR).

Actualmente su diagnóstico se basa en hallazgos fisiopatológicos como placas extracelulares de β -amiloide y ovillos neurofibrilares en el interior de neuritas formados por proteína tau hiperfosforilada. Estas acumulaciones patológicas llevan a una desregulación de la sinapsis y pérdida neuronal asociada a neuroinflamación y gliosis. Dichos cambios son objetivables gracias a la neuroimagen donde se ve un aumento de captación en el PET en las etapas más tempranas de la enfermedad y pérdida de volumen en áreas hipocámpicas y de la corteza conforme avanza la demencia (11).

Cabe mencionar que la expresión de ApoE en su isoforma E4 es el factor de riesgo genético más importante para padecer una EA esporádica. Su función fisiológica es actuar como receptor de lipoproteínas (LDL) en la membrana de los astrocitos, lo que le confiere un rol fundamental en el suministro bioenergético existente de los astrocitos a las neuronas, las cuales no son capaces de procesar los ácidos grasos por sí solas (12). La presencia de esta

isoforma influye en la homeostasis existente entre la neuroglía y las neuronas generando un estado de desregulación en el que se desencadena la neuroinflamación y acumulación lipídica en el interior de los astrocitos. Esta tendencia a la reserva de lípidos exacerba la producción de señales proinflamatorias por la propia célula glial y aumenta la lipotoxicidad de la que luego hablaremos (13).

Son precisamente los hallazgos descritos en esta patología sobre la alteración de depósitos lipídicos los que han servido de base para generar la hipótesis que planteamos en este trabajo.

1.3.2 PARKINSON (EP)

Este desorden neurodegenerativo está definido por una pérdida de neuronas dopaminérgicas y gliosis reactiva a nivel de la sustancia negra que proyecta al putamen (vía nigroestriatal) (14). La disminución en la acción de la dopamina a este nivel desencadena síntomas definitorios de la patología como el temblor de reposo, la rigidez muscular, bradicinesia y problemas de equilibrio y coordinación. Su etiología es predominantemente desconocida. Aunque se haya encontrado alguna asociación genética o ambiental, en la mayoría de los casos no se encuentra una causa concreta (15).

Los cambios histopatológicos encontrados son la acumulación en el pericarion de las neuronas dopaminérgicas en degeneración de la proteína α -sinucleína, normalmente a nivel de los terminales presinápticos. Se cree que el inicio de la muerte celular comienza con la interrupción de la integridad de la envoltura nuclear con su consecuente liberación al citoplasma de sustancias proagregantes como las histonas que harían precipitar a la α -sinucleína, formando los llamados cuerpos de Lewy.

Estos cuerpos de Lewy en la EP tienen una distribución característica afectando de manera predominante a las neuronas de la sustancia negra, núcleos del rafe, tegmento mesopontino, locus ceruleus, núcleo basal de Meynert y núcleo motor dorsal del vago, donde suele comenzar la enfermedad.

Por otro lado, los cambios vistos específicamente en cerebelo de esta enfermedad han sido poco estudiados, aunque hay descritas inclusiones de ubiquitina y degeneración de las células de Purkinje, además de hinchazón axonal de las mismas en forma de “torpedos”. En estudios actuales se ha demostrado cómo ganglios basales y cerebelo están anatómicamente conectados a través del tálamo (lugar de paso de ambas vías para conectar con la corteza motora), lo que podría explicar la contribución del cerebelo en la clínica parkinsoniana típica (16).

1.3.3 DEMENCIA FRONTOTEMPORAL (DFT)

Patología de causa neurodegenerativa que viene definida por un síndrome clínico caracterizado por cambios en el comportamiento, la personalidad y/o el lenguaje. Se puede dividir en subtipos diferentes atendiendo a la clínica predominante, como son: variante conductual, afasia progresiva primaria, variante no fluida o semántica. Otros rasgos que definen esta clase de demencia son una degeneración constatable de los lóbulos cerebrales frontal y temporal (17). La atrofia específica del cerebelo se describe de manera predominante en un subtipo de la enfermedad en el que el gen mutado es el de la proteína tau de marco de lectura abierto 72 del cromosoma 9 (C9orf72), en el resto de subtipos no se han observado hallazgos en esta región encefálica.

Al igual que la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, se ha visto una acumulación anormal intracelular de una proteína patológica en los pacientes que presenta este síndrome clínico. En este caso, las formas molecularmente identificadas son la proteína tau (DFT-Tau), la TDP-43 (DFT-TDP) y la FUS (DFT-FUS) (18) .

1.3.4 CREUTZFELDT-JAKOB (ECJ)

Enfermedad neurodegenerativa caracterizada por presentar una proteína infecciosa llamada “prión” en el SNC, la cual forma agregados produciendo una señal hiperintensa en la resonancia magnética funcional (RM). Este hecho tiene como consecuencia el desarrollo de síntomas psiquiátricos, disfunción cognitiva progresiva, clínica motora, hasta acabar en un mutismo acinético y la muerte del paciente en una media de unos 18 meses, aunque la mayoría de ellos fallece antes de los 6 meses (19).

Algunos de los cambios histológicos que han sido descritos clásicamente y que son fundamentales para su diagnóstico son: cambios espongiiformes, astrocitosis, pérdida neuronal y la formación de placas de la isoforma patológica PrP^{Sc} (isoforma con plegamiento anómalo que se diferencia de la proteína prión fisiológica PrP^C en un cambio en su estructura terciaria que, además de convertirla en infecciosa, le dota de propiedades como solubilidad disminuida y resistencia a proteasas aumentada). El cerebelo se ha visto comúnmente afectado en esta enfermedad con una pérdida constatable de neuronas a nivel de la capa granular y molecular. Por otro lado, en las neuronas de Purkinje se ha descrito la formación de torpedos, con pérdida e hipertrofia de la arborización dendrítica de este subtipo celular, sin constatar una pérdida neuronal tan significativa como la de las neuronas en grano en los casos avanzados de la enfermedad (20).

Existen varios subtipos descritos para este tipo de demencia: esporádica (ECJe), variante (ECJv), iatrogénica (ECJi) y familiar (ECJf). De entre ellos, la ECJv resulta de la exposición del paciente a la encefalopatía espongiiforme bovina, EEB, por ingestión de carne contaminada (21).

1.3.5 ATAXIA DE FRIEDERICH (AF)

Enfermedad hereditaria autosómica recesiva, causada por una mutación por expansión repetida del triplete GAA en el brazo largo del cromosoma 9. A pesar de ser una patología neurodegenerativa que afecta al cerebelo, no está clasificada como proteínopatía.

Se caracteriza por afectación multisistémica centrándose en el sistema nervioso y produciendo síntomas progresivos como la ataxia, disartria, disminución de la sensibilidad propioceptiva o la cardiomiopatía y la DM. Su edad de aparición más frecuente es entre los 10 y 15 años.

El cambio genético existente impide la síntesis adecuada de la proteína frataxina, una proteína de localización mitocondrial que participa en la regulación del hierro intracelular. Se cree que concentraciones inadecuadas de esta proteína producen un mayor estrés oxidativo y lleva a la muerte celular.

La neurodegeneración que tiene lugar en esta enfermedad parece producir la muerte neuronal activando vías de apoptosis y de autofagia. Los lugares de mayor afectación dentro del SNC han sido tradicionalmente descritos como la médula espinal, principalmente en los ganglios de la raíz dorsal y columnas dorsales, y el núcleo dentado del cerebelo. Específicamente en el cerebelo se ha descrito marcada atrofia del núcleo con pérdida de neuronas

glutaminérgicas y degeneración grumosa de terminales sinápticos, sobre todo afectando a las neuronas de mayor calibre (22).

Aparte de esto, recientemente hay una creencia creciente sobre la afectación también de las conexiones entre la corteza y el cerebelo afectando a la sustancia blanca que las conecta y a la corteza cerebral. Estas dudas se sustentan en que el núcleo dentado es de donde salen la mayor cantidad de fibras eferentes cerebelosas hacia la corteza y es un lugar de acumulación de hierro de forma natural, sustancia que ya hemos mencionado que va a sufrir una redistribución en los pacientes que sufren AF. En general se han visto cambios en la conectividad funcional cerebelo-cerebral por la vía cerebelo-tálamo-corteza (23).

1.3.6 ENFERMEDAD DE LA MOTONEURONA (EMN)

Es otra enfermedad neurodegenerativa que afecta de manera específica a las motoneuronas provocando síntomas como debilidad muscular, fasciculaciones, atrofia... hasta terminar con una parálisis de la totalidad de músculos del cuerpo.

La variante más conocida es la ELA y en esencia consiste en un síndrome motor progresivo de inicio asimétrico y con clínica de primera (espasticidad, reflejos exaltados) y de segunda motoneurona (atrofia, debilidad, fasciculación). Es una enfermedad de un curso que se podría considerar lineal y que termina con la muerte del paciente en un 50% de los casos en unos 30 meses.

La principal causa de muerte celular es el transporte anormal transaxonal a través del citoesqueleto en el que influye una proteína identificada con el nombre de dinactina-1. A parte de este hallazgo, dentro del citoplasma de las motoneuronas situadas en la médula aparecen inclusiones ubiquitinadas de diferentes etiologías (TDP-43, cuerpos de Bunina, hialinas...) (24).

Centrándonos en el cerebelo, los cambios histológicos vistos a este nivel están directamente relacionados con la gravedad de la enfermedad y se relacionan con apatía, síntomas motores y deterioro cognitivo. Respecto a estos cambios, se describen en muestras analizadas *post mortem* de cerebelo inclusiones de ubiquitina, ovillos neurofibrilares y patología TDP-43. Otro de los cambios observados en RM en el transcurso de la enfermedad es una sobre-activación cerebelosa al realizar tareas motoras y funcionales en reposo. La explicación que se ha encontrado a este hallazgo ha establecido como causa principal la neuroplasticidad neuronal y cambio adaptativo compensatorio de nuestro cerebro para aminorar la clínica de la enfermedad cuando la degeneración es mayor en otras áreas como la corteza motora. Otra de las teorías propuestas es que esta sobre-activación cerebelosa se debe a una pérdida de la inhibición cortical, ya que no se ha demostrado una hipertrofia cerebelosa ni en estudios de neuroimagen ni histológicos (25).

1.3.7 ENFERMEDAD DE HUNTINGTON (EH)

Enfermedad hereditaria autosómica dominante la cual basa su patogenia en la repetición expansiva de un triplete de nucleótidos en el cromosoma 4, que lleva a la expresión anómala de una proteína llamada huntingtina. Esta proteína patológica precipita en el núcleo y citoplasma neuronal llevando a la muerte de la misma, afectando de forma preferente al núcleo estriado seguido del caudado, putamen y segmento externo del globo pálido. Los

mecanismos de muerte celular, derivada del acúmulo de huntingtina mutada, son la apoptosis, el desequilibrio metabólico, interacciones de proteínas tóxicas, excitotoxicidad y trastornos transcripcionales, entre otros (26).

Por otro lado, su expresión clínica consiste en la aparición de movimientos coreiformes involuntarios, cambios psicológicos y demencia, que suelen comenzar en edades intermedias de la vida (27).

En el transcurso de la enfermedad se ha visto que, aunque hay una afectación predominante del núcleo estriado, algunos de los síntomas que van apareciendo como el desequilibrio en la marcha o la disartria podrían ser explicados por una afectación concomitante del cerebelo. A pesar de que la estructura cerebelosa se ve afectada con la progresión de la patología, en estadios iniciales se ha visto cómo ante un hipometabolismo en el núcleo estriado hay una hiperactivación de otros puntos del SNC como el vermis cerebeloso. Esto nos conduce a la hipótesis, ya antes planteada en este trabajo, de que hay una actitud compensadora que lleva a cabo el cerebelo para paliar la sintomatología motora en las principales enfermedades neurodegenerativas con afectación motora.

Otros estudios en cerebelo han analizado la timosina $\beta 4$ por inmunohistoquímica en base a su asociación con la activación microglial. Se relacionó la activación de la microglía en localizaciones más cercanas a los cúmulos de huntingtina, dato que se suma a la elevación de marcadores de neuroinflamación como son el IL-6, IL-8 y MMP9. Los estudios anatomopatológicos que se han llevado a cabo hasta ahora en cerebelo informan de una pérdida de neuronas de Purkinje en pacientes con EH, con síntomas predominantemente motores (28).

1.3.8 PRIONOPATÍA VARIABLE SENSIBLE A PROTEASAS (PRVSP)

Enfermedad neurodegenerativa caracterizada por el depósito de proteína priónica en el SNC de forma esporádica, en la que no se han identificado mutaciones en el genoma que la causen. La evolución de la enfermedad dura una media de unos 30 meses, algo más que la otra enfermedad priónica descrita en el trabajo conocida como ECJ. La causa para ello puede ser la mayor sensibilidad al ataque por proteasas por parte del prión patógeno que precipita en esta enfermedad.

A nivel histopatológico se han identificado cambios espongióticos y microplacas del contenido proteico patológico en el cerebelo. La sintomatología más común es la presentación de síntomas psiquiátricos, ataxia y problemas de lenguaje(29) .

1.4 ALTERACIONES LIPÍDICAS Y NEURODEGENERACIÓN

Como ya se ha indicado anteriormente, la única enfermedad que ha sido hasta ahora objeto de estudio en relación con la alteración del metabolismo lipídico es la EA. En concreto, se ha demostrado que el gen ApoE y sus diferentes isoformas actúan como factores de riesgo o de protección a la hora de padecer la enfermedad, lo que sugiere un papel clave en la neuropatología de la enfermedad. Este mencionado gen tiene 3 isoformas (E2, E3 y E4) conocidas dentro de la especie humana que difieren entre sí en dos únicos aminoácidos localizados en la posición 112 y 158 de la proteína que codifica.

El epicentro de la cadena de sucesos es el haplotipo de la lipoproteína E4. La isoforma 4 de la proteína ApoE tiene una menor capacidad para el transporte lipídico y de colesterol. Este hecho, hace que la ApoE4 esté relacionada con un aumento de gotas lipídicas en el interior astrocitario y una consecuente desregulación metabólica entre astrocitos, neuronas y oligodendrocitos. Como consecuencia de una vehiculización de colesterol disminuida entre astrocitos y

neuronas, estas últimas sufren cambios en la sinapsis (sinaptopatías) observándose un menor número de vesículas en la hendidura sináptica (30).

Los oligodendrocitos, por su parte, también sufren esta falta de colesterol teniendo problemas para llevar a cabo la producción de mielina, sustancia rica en este lípido. Este hecho conlleva fallos en la remielinización y en la diferenciación de los oligodendrocitos, pudiendo ser causante de las anomalías descritas a nivel de la sustancia blanca en la EA (31).

Respecto de la microglía, se ha visto que en los portadores de la isoforma E4 se observa una fagocitosis disminuida, lo que facilita la acumulación de β -amiloide en el medio extracelular, además de una predisposición al cambio en su fenotipo a inflamatorio al inflamatorio. Por otro lado, se ha sido visto una acumulación de lípidos en el interior celular de la neuroglía que puede actuar como causa para este cambio fenotípico.

En conjunto, la captación deficiente de colesterol por parte tanto de la microglía como de los astrocitos hacen que aumente la concentración de este lípido en el medio extracelular, pudiendo activar así canales de potasio en la superficie de las neuronas (32).

Cabe añadir que no sólo se diferencia esta isoforma en un menor transporte lipídico hacia el exterior celular, sino también en un cambio en la afinidad de unión como receptor de membrana a moléculas lipoproteicas con un mayor contenido graso como son las VLDL. Ello hace que el contenido de las lipopartículas secretadas por astrocitos en su fenotipo tóxico, a diferencia de los astrocitos en su forma fisiológica, se diferencie en la presencia de ácidos grasos libres saturados de cadena larga y fosfatidilcolinas, principalmente. Esta forma de lípidos está poco presente en la célula de forma natural y pueden llegar a inducir una clase de muerte celular conocida como lipoapoptosis. La teoría aquí descrita ha sido propuesta como modelo de muerte neuronal mediada por lipopartículas astrocitarias, lo que convierte a los astrocitos y lípidos en protagonistas en el proceso de neurodegeneración (5).

Este argumento anterior sobre la lipoapoptosis servirá como base para la hipótesis planteada en este trabajo, que plantea buscar cambios en los depósitos lipídicos en el encéfalo de pacientes que sufren enfermedades relacionadas con la neurodegeneración.

A este argumento se le suma la observación, tras la eliminación selectiva del gen ApoE4 en modelos murinos, de una disminución en la patología tau, gliosis, neurodegeneración (menor pérdida neuronal), hiperexcitabilidad neuronal y déficits de mielina (33).

En la **Figura 2** encontramos un resumen de lo previamente descrito.

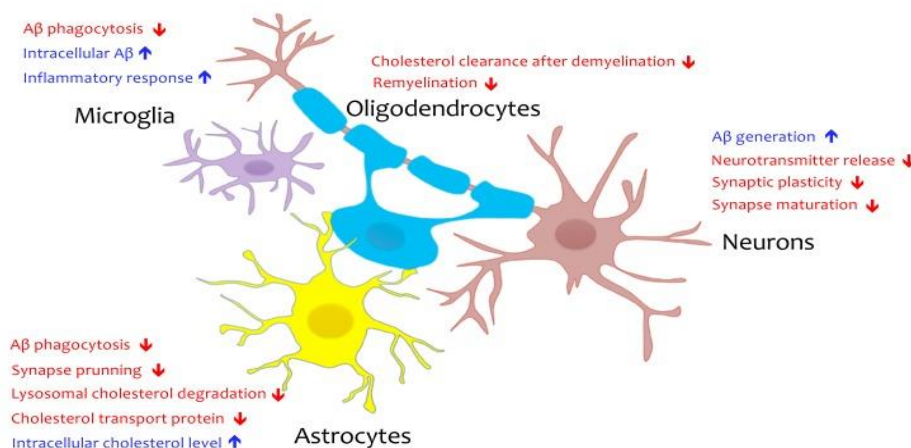


Figura 2. Esquema de los principales cambios en el metabolismo de las células del SNC con la expresión de ApoE4 (30)

1.5 HISTOLOGÍA DEL CEREBELO

En este estudio se aplica un protocolo de tinción sobre cortes histológicos de cerebelo, por lo que nos resulta importante hacer una descripción general de la histología de esta región encefálica para entender mejor los resultados obtenidos (34).

El cerebelo ejerce la función del control y aprendizaje motor, aunque cada vez más se reconoce su papel en la mediación de las funciones cognitivas, conductuales, el lenguaje, así como la regulación del ánimo (35). Es una estructura encefálica con una arquitectura muy bien conocida, siendo descrita por Ramón y Cajal ya en el año 1911. En su macroestructura consta de dos *hemisferios* cerebelosos que se sitúan lateralmente, y en la parte medial entre ambos se localiza el *vermis*. Su superficie está formada por surcos conocidos como fisuras que subdividen la corteza cerebelosa en lóbulos.

La corteza cerebelosa se subdivide en tres capas histológicas.

1.5.1 CAPAS DE LA CORTEZA DEL CEREBELO (36)

1. **Capa molecular:** capa más externa constituida principalmente por neuropilo y a la que llegan las dendritas de las células de Purkinje (situadas en la capa inferior), los axones de las neuronas grano, que en ella darán lugar a las fibras paralelas y las fibras trepadoras.

Su contenido celular lo dan dos clases de interneuronas inhibitorias llamadas células estrelladas y en cesta debido a su morfología, y algunas células gliales radiales que forman la glía de Bergmann.

2. **Capa de células de Purkinje:** formada principalmente por los somas de las neuronas de Purkinje estableciendo conexión con algunas terminaciones neuronales de otros tipos de neuronas como las en cesta previamente nombradas. Son las neuronas más grandes del cerebelo y ocupan unos 30 μm de grosor. En su interior se han identificado grandes cisternas de retículo endoplasmático rugoso y multitud de mitocondrias que sugieren un metabolismo muy activo.

Sus dendritas se dirigen hacia el espesor de la capa molecular y su único axón entra en la granular en dirección a establecer sinapsis con los núcleos cerebelosos profundos. Las dendritas tienen una forma característica que ha sido descrita con el nombre de “árbol dendrítico”, el cual se dirige perpendicularmente

a la corteza cerebelosa y acaba dando lugar a multitud de botones sinápticos donde se produce la sinapsis con fibras musgosas y trepadoras que traen información propioceptiva de todas las partes del cuerpo.

3. Capa granular: su componente fundamental son las neuronas en grano, aunque también se pueden encontrar otros tipos celulares como las células de Golgi, células en candelabro o neuronas unipolares.

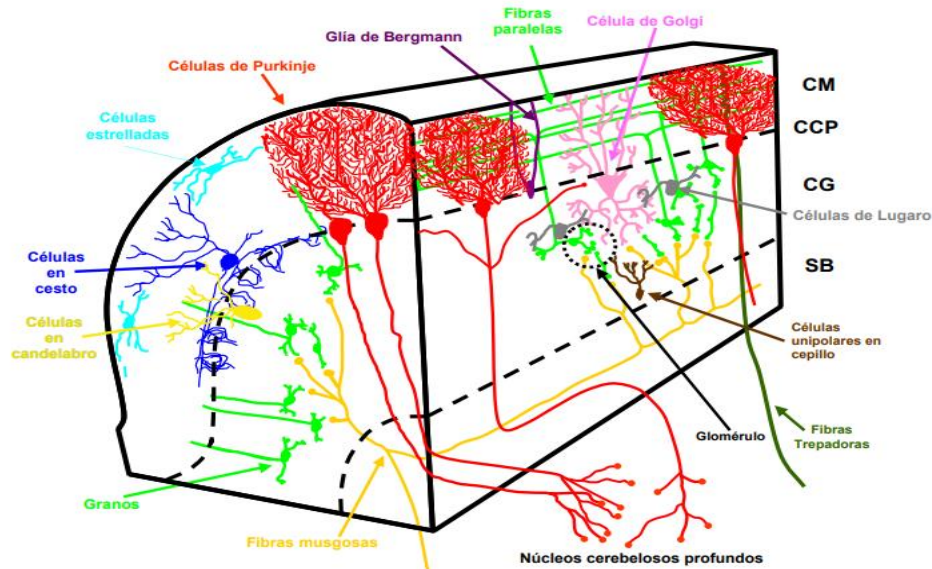


Figura 3: Representación de las diferentes clases celulares y sus prolongaciones dentro de las capas de cerebelo(37)

Además de la corteza (Figura 3), que formará la sustancia gris cerebelosa, se encuentra la sustancia blanca, donde se agrupan los axones de las conexiones aferentes y eferentes que entran y salen del cerebelo, además de células de la glía como astrocitos, microglía y oligodendrocitos.

1.5.2 CONEXIONES CEREBELOSAS

El cerebelo es el responsable de la regulación de características específicas del movimiento como es la coordinación, la precisión o el mantenimiento del tono muscular.

Para realizar estas funciones recibe información que tiene su origen tanto en los diferentes grupos musculares y articulaciones, como del SNC.

Aferencias:

1. Fibras musgosas: se originan en los núcleos vestibulares y la médula espinal estableciendo sinapsis en el interior de la granular en estructuras específicas llamadas “glomérulos”. Los glomérulos están constituidos, además de por las fibras musgosas, por botones dendríticos de las neuronas en grano y células unipolares.
2. Fibras trepadoras: tienen su origen en el núcleo de la oliva inferior y cruzan hasta la capa molecular para establecer sinapsis con las dendritas en una sola célula de Purkinje.

Eferencias: los axones de las células de Purkinje son los únicos que salen de la corteza cerebelosa para establecer sinapsis con los núcleos cerebelosos localizados más internamente.

Desde estos núcleos saldrán a su vez fibras nerviosas que conectarán el cerebelo con otras áreas de la corteza cerebral.

2. OBJETIVOS

La activación de las células gliales y, en concreto, de los astrocitos ya sea hacia su forma neuroprotectora o hacia su forma neurotóxica, es una constante dentro de las enfermedades neurodegenerativas.

Uno de los papeles fundamentales de esta población celular es servir de apoyo metabólico a las neuronas proporcionándoles múltiples moléculas necesarias para su adecuado metabolismo. Unas de estas moléculas son los lípidos, cuya alteración ya ha sido relacionada con la EA.

En este trabajo queremos comprobar si estas mismas alteraciones en el metabolismo lipídico se asocian también a otras enfermedades neurodegenerativas. Utilizando una tinción fluorescente específica para estas biomoléculas, se pretende determinar si hay variaciones de los acúmulos lipídicos en secciones de cerebelo de pacientes afectados por todas las proteinopatías incluidas en el apartado de Introducción.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para este estudio se han incluido un total de 44 muestras biológicas (Tabla 1) obtenidas de pacientes con diagnóstico de diferentes enfermedades neurodegenerativas: 3 con demencia frontotemporal (DFT), 3 Huntington (EH), 9 con Creutzfeldt-Jakob esporádico (ECJe), 3 Creutzfeldt-Jakob familiar (ECJf), 3 Creutzfeldt-Jakob idiopático (ECJi), 3 variantes de Creutzfeldt-Jakob (ECJv), 3 con prionopatía proteasa-sensible variable (PrVSP), 3 Parkinson (EP), 3 Alzheimer (EA), 3 con enfermedad de las neuronas motoras (EMN) y 1 con una forma de Alzheimer familiar (Eaf). También se usaron muestras adicionales de pacientes no afectados por ningún tipo de demencia como controles sin patología, 6 en total. Las muestras de ECJ fueron provistas por el banco de tejidos humanos del Hospital de Alcorcón (HUFA Biobank, Madrid-Spain). El resto, fueron cedidas por el *Centre for Clinical Brain Sciences* de la Universidad de Edimburgo. En ambos casos, se siguió las directrices de la legislación nacional sobre este asunto.

Los estudios desarrollados sobre estas muestras biológicas mencionadas fueron aprobados por parte del Comité Ético Investigación Clínica del Gobierno de Aragón (CEICA; NÚMERO DE REFERENCIA: PI 15/0036, Acta N° 05/2015).

Tabla 1: identificación de las muestras incluidas en el estudio y datos relevantes a los que se ha tenido acceso

DIAGNÓSTICO	EDAD, SEXO	GENOTIPO	ID
CONTROL	69-F		H64/15
CONTROL	63-M		H65/15
CONTROL	74-M		H66/15
DFT	78-F		H67/15
DFT	69-M		H68/15

DFT	74-M		H69/15
EH	63-M		H70/15
EH	48-F		H71/15
EH	70-M		H72/15
sEJD	70-M	MM2	H73/16
sEJD	70-M	MM2	H74/16
sEJD	78-F	MM1	H75/16
sECJD	71-M	MV2	H76/16
sEJD	63-F	MV2	H77/16
sEJD	71-F	MV2	H78/16
sEJD	74-M	VV2	H79/16
sEJD	73-F	VV2	H80/16
SCJD	77-F	VV2	H81/16
sEJD	56-F	MM/E200K	H82/16
fEJD	78-M	MV/E200K	H83/16
fEJD	53-F	MM/E200K	H84/16
iEJD	42-M	MM1 (GHT)	H85/16
iEJD	34-F	MV1+2 (GHT)	H86/16
iEJD	27-F	MM1 (DURA)	H87/16
vEJD	59-M	MM	H88/16
vEJD	62-M	MM	H89/16
vEJD	32-F	MM	H90/16
VpSPR	66-M	VV	H91/16
VpSPR	76-F	VV LM WT	H92/16
VpSPR	66-M	MV	H93/16
EP	79-M		H94/16
EP	89-F		H95/16
EP	84-M		H96/16
CONTROL	68-?		H97/16
CONTROL	74-?		H98/16
CONTROL	66-M		H99/16
EA	-		H100/16
EA	-		H101/16
EA	-		H102/16
Eaf	-		H103/16
EMN	-		H104/16
EMN	-		H105/16
EMN	-		H106/16

Las muestras fueron sometidas a una tinción específica de lípidos llamada *LipidTox* (Invitrogen), siguiendo el protocolo establecido por la empresa suministradora.

Partimos de secciones sagitales de tejido de entre 4 y 5 µm fijadas en formalina e incluidas en parafina que han sido desactivadas tras una inmersión durante 1 hora en ácido fórmico. Se comienza desparafinando las muestras por inmersión xilol durante 3 minutos (x 2) y rehidratándolas en alcoholes de gradaciones decrecientes (100° - 100° - 96° - 96° - 70°) durante 3 minutos cada una. Finalmente se sumergen en agua corriente 5 minutos y 1 minuto en agua destilada.

A continuación, se incuban las preparaciones con 400 µL de la tinción *LipidTox* (dilución 1:200 en PBS 0,02 mmol/L) durante 30 - 35 minutos a temperatura ambiente para posteriormente realizar tres lavados sucesivos en PBS durante 5 minutos cada uno.

Al finalizar, las muestras se visualizan con el microscopio de fluorescencia (OLYMPUS BX51) bajo un filtro que permite la observación de acumulaciones lipídicas en un rojo flúor.

4. RESULTADOS

Para comenzar a describir los hallazgos encontrados en las diferentes muestras, empezaremos por exponer lo que se observa en el cerebelo de pacientes que no presentan patología neurodegenerativa. Una vez descritas estas observaciones, trataremos de establecer las diferencias evidenciadas a lo largo del presente trabajo, nombrando sólo aquellas que difieren de lo descrito en los controles.

En todas las preparaciones utilizadas como **control** se ha podido ver, como hallazgo destacable común en todas ellas, una banda fluorescente que mantiene una continuidad lineal a lo largo de la muestra prácticamente coincidente con la capa de células de Purkinje, uniendo estas neuronas entre sí y separando las capas molecular y granular. En cuanto a la capa molecular, se observan células con un citoplasma más fluorescente entre las fibras que captan peor la fluorescencia. En la capa de Purkinje destacan fundamentalmente vesículas pequeñas que captan fluorescencia en el interior de estas neuronas. Además, de forma general, en la zona de la capa granular más cercana a la capa de Purkinje, se encuentran células con un citoplasma cargado de gotas lipídicas que captan de manera predominante la fluorescencia (Figura 4A). Estas células son poco frecuentes, a diferencia de lo observado, como comentaremos posteriormente, en algunas enfermedades neurodegenerativas. Por último, a nivel de la sustancia blanca, el patrón de fluorescencia se localiza cercano a los núcleos celulares y en los haces de fibras nerviosas. A lo largo de los haces nerviosos (axones y dendritas) estos infiltrados lipídicos que captan fluorescencia se distribuyen longitudinalmente siguiendo la misma dirección que la de las fibras nerviosas donde parecen albergarse, mientras que cuando la fluorescencia la encontramos cercana al núcleo adquiere una morfología menos lineal y más granular o esférica (Figura 4B).

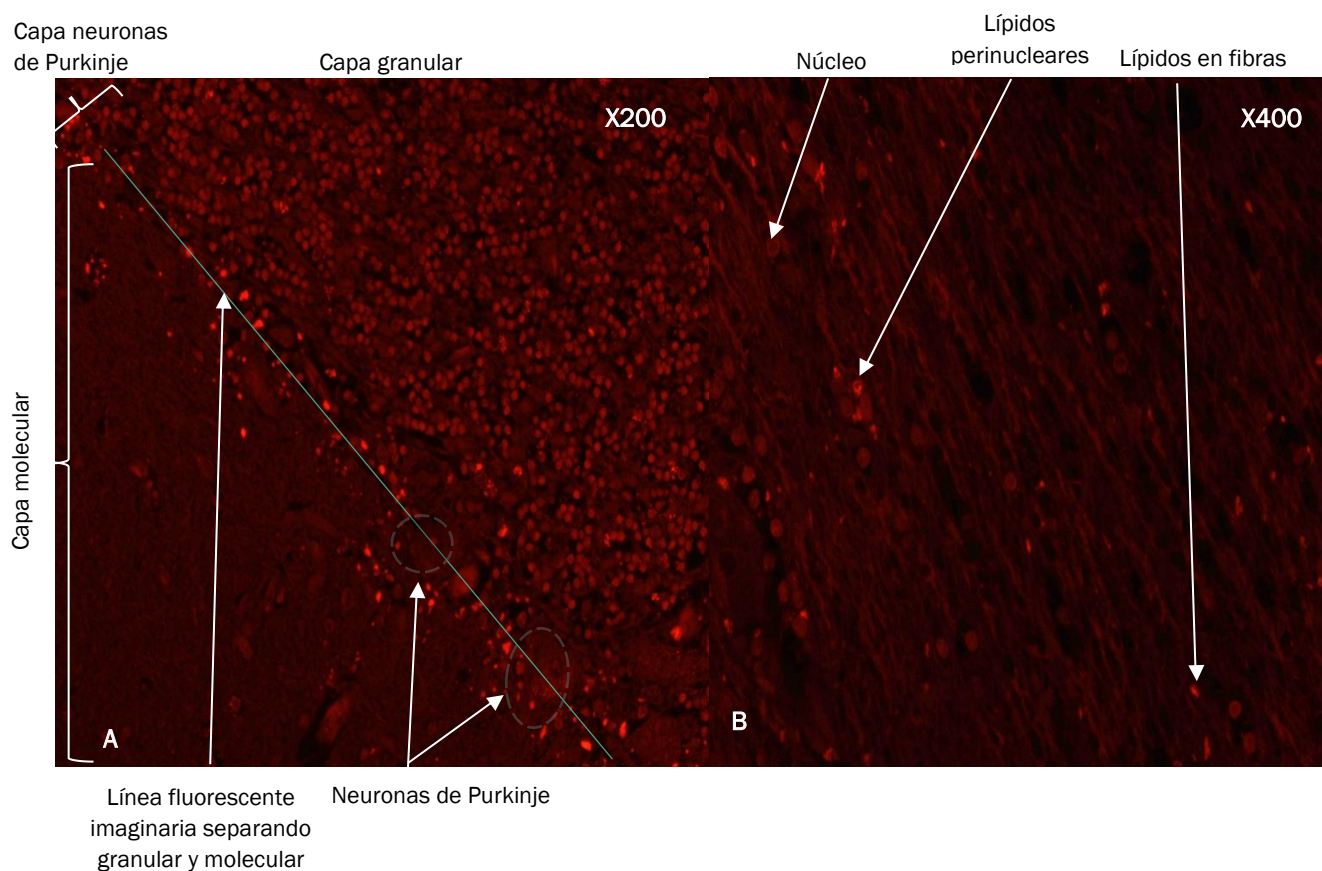


Figura 4. Patrones de fluorescencia encontrados en las muestras control.

4A) Corteza cerebelosa donde se visualizan las tres capas que la componen: molecular, de Purkinje y granular (de izquierda a derecha). Se visualiza una banda de fluorescencia formada por acúmulos fluorescentes que separan molecular y granular conectando las neuronas de Purkinje. La anchura de esta banda es prácticamente la misma que la de la capa de Purkinje.

4B) Sustancia blanca del cerebelo donde se ven los núcleos celulares asociados a fluorescencia de tipo granular y las fibras nerviosas que se ven infiltradas en su recorrido por algún acúmulo fluorescente de morfología más lineal.

Siguiendo con la descripción de los resultados de la tinción en las muestras de la **EA**, por ser la primera donde se han encontrado cambios en la acumulación lipídica asociados al proceso de neurodegeneración, se debe mencionar en primer lugar un cambio significativo en la morfología de la banda fluorescente observada en la capa de Purkinje. En el caso de esta patología, se trata de una banda menos uniforme, que sufre interrupciones y con una menor densidad de fluorescencia. Sumado a este hallazgo, en la zona más próxima a estas neuronas en la capa granular, se encuentran de manera frecuente, células cargadas de vesículas lipídicas que captan fluorescencia en su interior (Figura 5A). Fijándonos ahora en la sustancia blanca, también se observan más acúmulos emitiendo una mayor fluorescencia, pero con formas más disruptivas. Los depósitos lipídicos antes mencionados que parecían que seguían longitudinalmente la dirección de los haces, ahora muestran una apariencia más granular y menos lineal, sin estar asociados de manera clara a los núcleos celulares (Figura 5B).

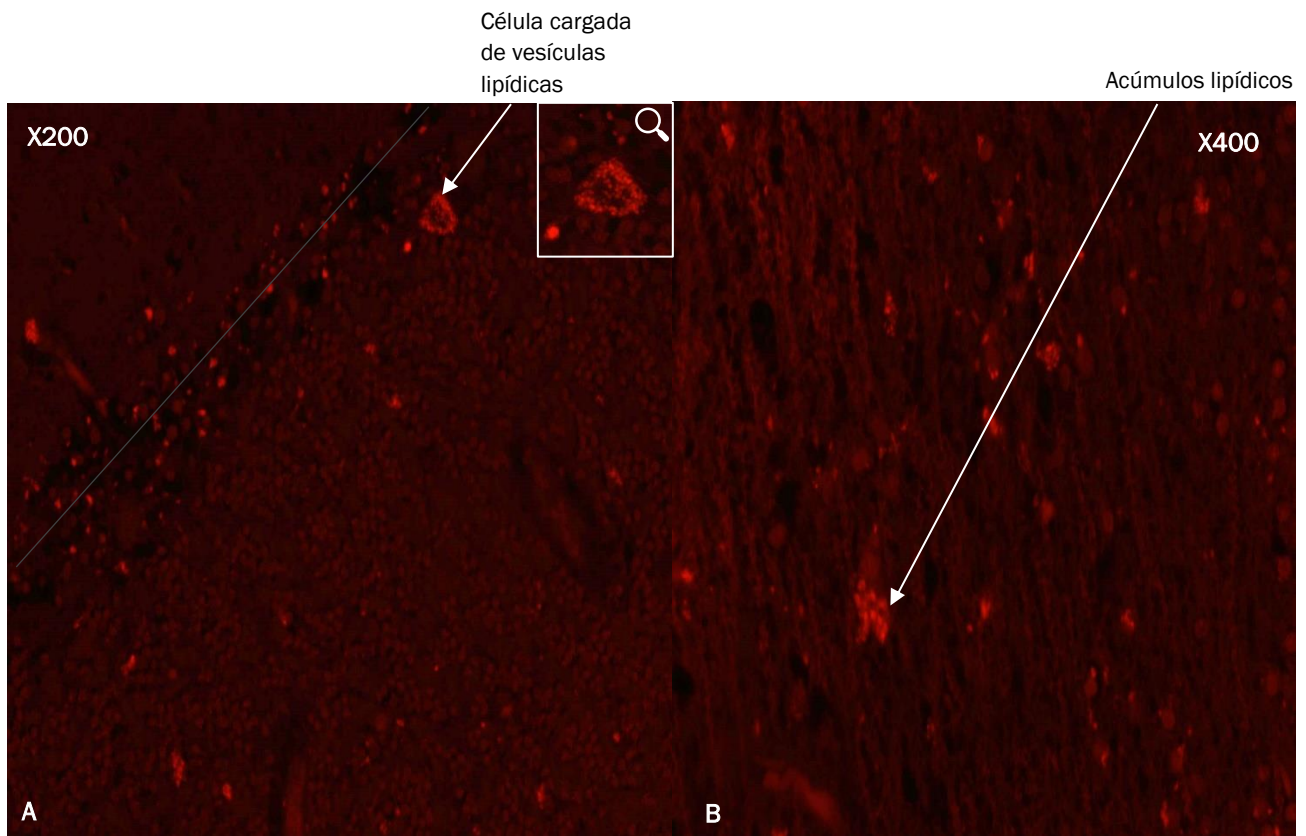


Figura 5. *Patrones de fluorescencia en EA.*

5A) Corteza cerebelosa con sus tres capas antes descritas. Se observa célula que capta mucha fluorescencia en forma de gotas en su interior. Por otro lado, la banda fluorescente que se veía claramente definida en el ejemplo del control aquí se ve quebrada y menos continua, haciendo más difícil intuir una línea imaginaria que la una.

5B) Sustancia blanca cerebelosa con mayor fluorescencia que control, con infiltrados de mayor tamaño e irregulares.

En la siguiente figura 6 podemos apreciar mejor las diferencias expuestas en el párrafo anterior:

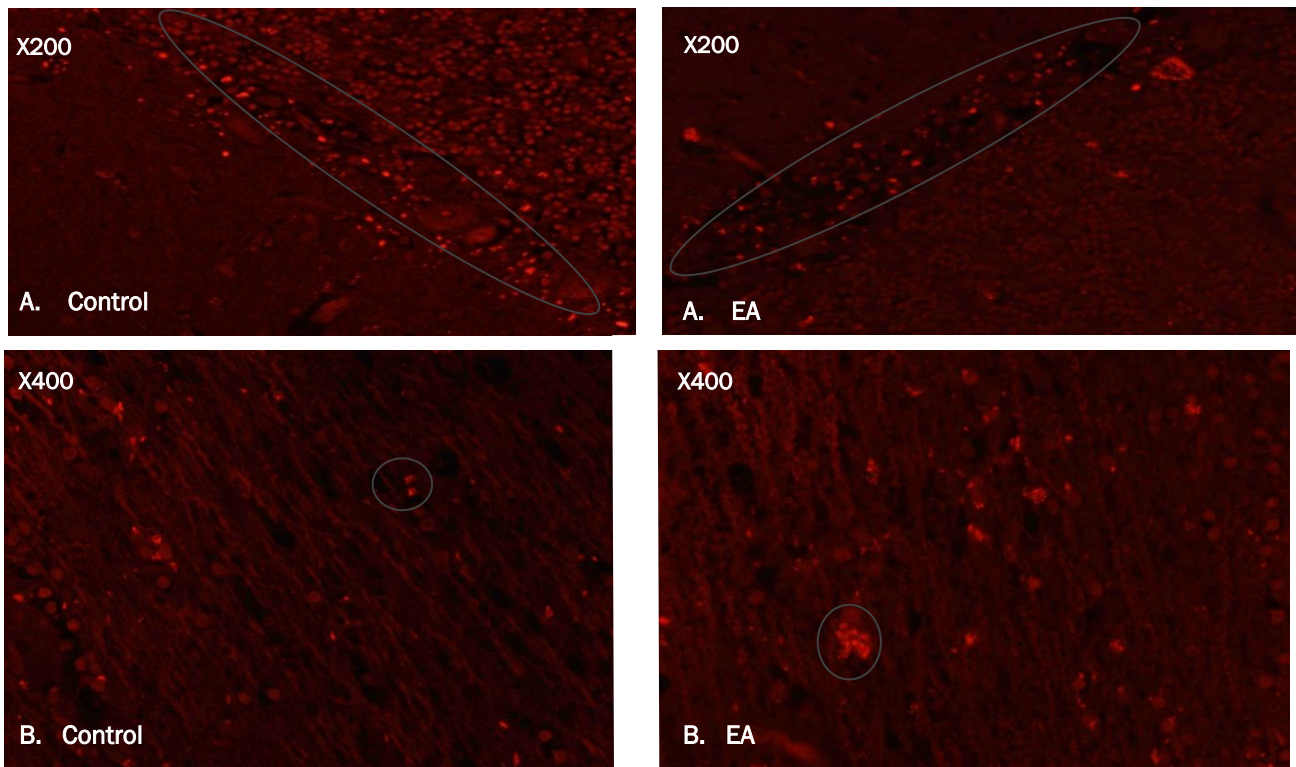


Figura 6. Comparación patrones de fluorescencia entre control y EA.

6A) Corteza cerebelosa donde se señala la banda fluorescente citada en el texto en controles y EA, mostrando una mayor discontinuidad en pacientes afectados de EA.

6B) Sustancia blanca cerebelosa en controles y EA. Se pueden ver infiltrados grasos con una morfología más granular en el caso de la EA.

Abordando ahora la **EP**, los cambios aquí vistos resultan similares a algunos ya descritos en las muestras de EA. En la capa granular, específicamente en su zona más próxima a las neuronas de Purkinje vuelven a aparecer células que captan mayor fluorescencia en forma de vesículas en su citoplasma. Aparte de este hallazgo, la banda de fluorescencia nombrada en controles aquí se ve de nuevo más irregular e interrumpida (Figura 7). Por último, en la sustancia blanca no se han apreciado cambios a lo ya detallado en el caso de los controles.

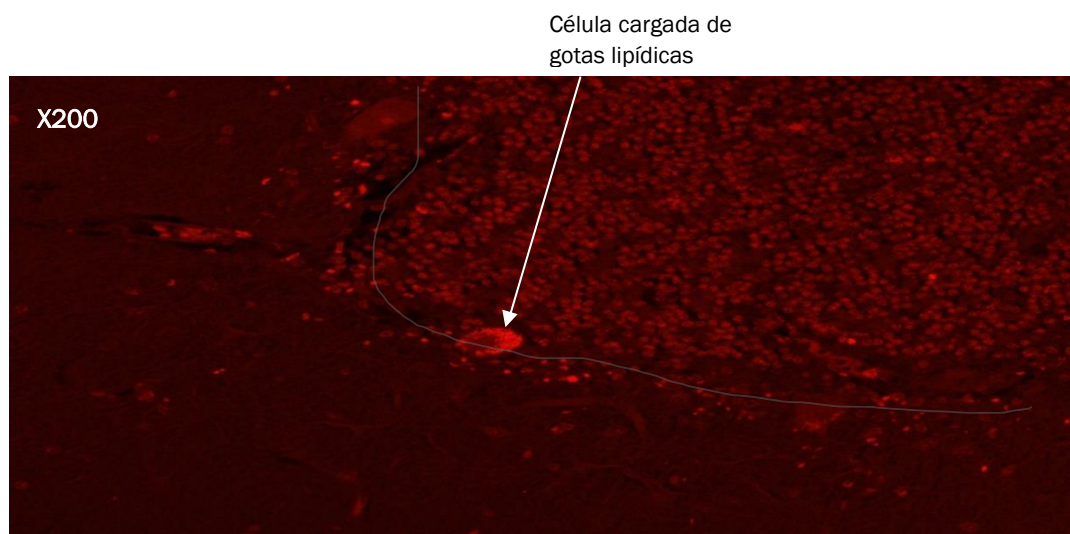


Figura 7. Patrón de fluorescencia en EP.

En esta figura se puede de nuevo observar la corteza cerebelosa con sus tres capas. Aparece una célula localizada cercana a las neuronas de Purkinje con marcada fluorescencia en su interior que capta en forma de gotas. La banda fluorescente descrita en controles aquí se ve interrumpida y más irregular.

Por parte de la **ECJ**, es importante mencionar que el cambio histopatológico más diferencial que es la vacuolización, no se encuentra relacionado con los depósitos lipídicos. De hecho, se demuestra una ausencia de fluorescencia en todas las regiones con degeneración espongiiforme característica de esta patología, observándose auténticos “agujeros negros” dentro del tejido neuronal y/o neuropilo vacuolizado tanto en sustancia gris (Figura 8A) como en sustancia blanca (Figura 8B). En sustancia gris, la vacuolización se centra en la molecular y alrededores de las Purkinje volviendo a dar la imagen de una banda de fluorescencia más irregular a este nivel. Otro hallazgo que cabe mencionar es la presencia de células con gotas fluorescentes intracitoplasmáticas localizadas cercanas a las neuronas de Purkinje similares a las expuestas previamente en este trabajo. En la sustancia blanca volvemos a no encontrar diferencias significativas con los patrones de fluorescencia descritos en controles, salvo por los “agujeros negros” consecuencia de la degeneración espongiiforme a este nivel.

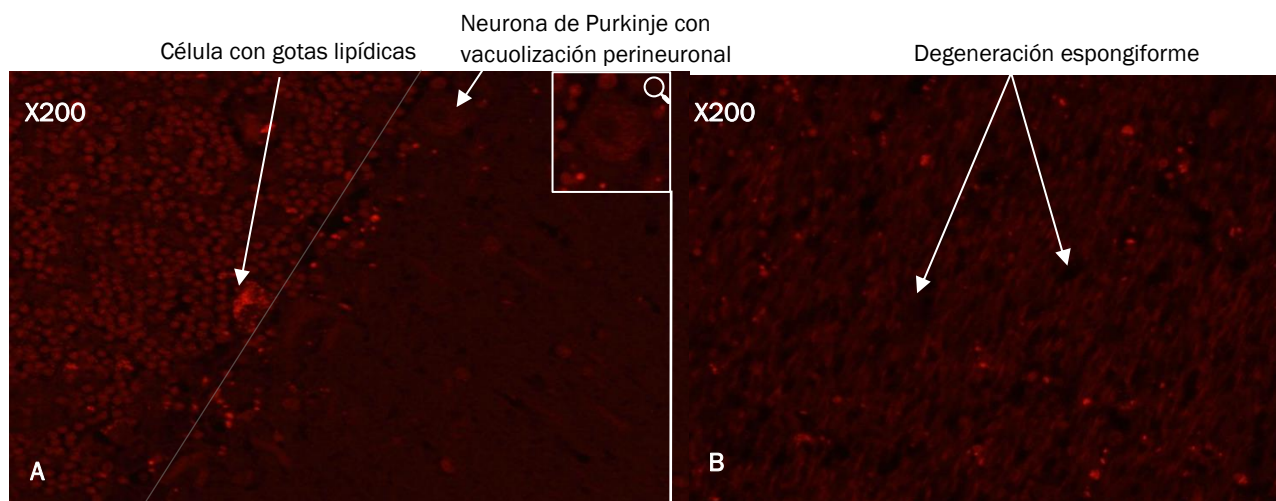


Figura 8. Patrones de fluorescencia en ECJ.

8A) Corteza cerebelosa con sus tres capas pudiendo verse la degeneración espongiiforme característica de esta enfermedad, tanto en la capa molecular como rodeando a las células de Purkinje (tal como se visualiza en la imagen ampliada de arriba a la derecha). Banda de fluorescencia menos uniforme que en el control. Cercana a las neuronas de Purkinje se localiza una célula con una fluorescencia distintiva en forma de vesículas, común con otras enfermedades neurodegenerativas.

8B) Sustancia blanca donde se aprecia la vacuolización característica de las enfermedades priónicas sin que se asocia fluorescencia a la misma.

Continuando con lo observado al microscopio en otras de las patologías neurodegenerativas, en lo referente a la **EMN**, se vuelven a encontrar una mayor cantidad de células cercanas a la capa de Purkinje con un citoplasma que

capta gran cantidad de fluorescencia en forma de vesículas. Nuevamente, la banda de fluorescencia descrita en controles se aprecia con continuidad distinta (Figura 9). En la sustancia blanca no se ven diferencias con el control.

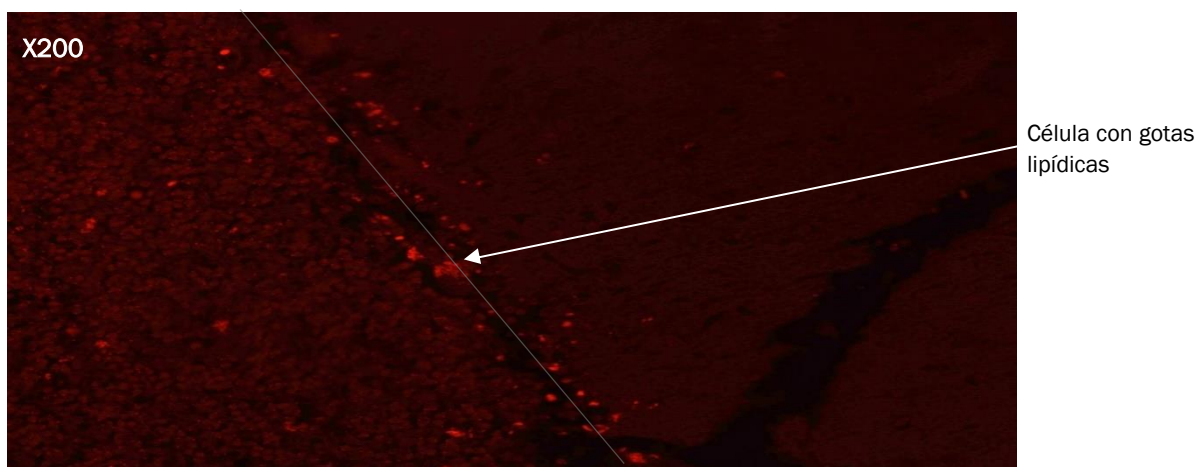


Figura 9. Patrones de fluorescencia en EMN.

Corteza cerebelosa con tres capas ya citadas, a nivel de las neuronas de Purkinje se encuentra una célula con el citoplasma repleto de gotas lipídicas fluorescentes.

La banda de fluorescencia cambia su conformación respecto a lo observado en controles, mostrándose más separada.

Por último, comentar algún detalle de las muestras de la **EH**. En las preparaciones incluidas en este estudio, sólo se considera destacable un cambio en la morfología de la banda fluorescente de células descrita en los controles, que en estas muestras se muestra con un grosor aparentemente disminuido en algunos puntos en relación con una pérdida de celularidad en esta capa (Figura 10).

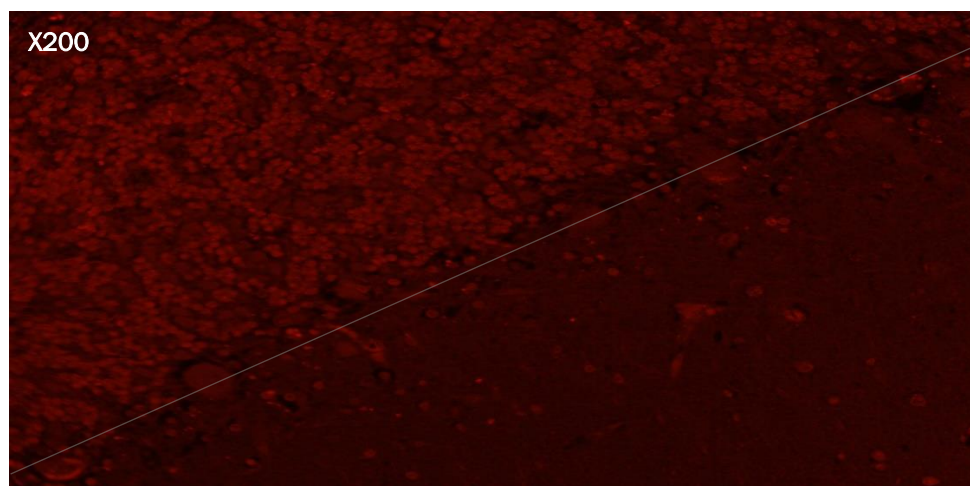


Figura 10. Patrones de fluorescencia en EH.

Corteza cerebelosa con las tres capas en las que se divide donde no hay acúmulos de fluorescencia a destacar y la banda fluorescente a lo largo de las células de Purkinje vista en controles apenas se intuye.

Sobre la **DFT**, poco resulta destacable a partir de lo observado en este estudio, puesto que los patrones de fluorescencia no difieren de lo descrito en los controles (Figura 11).

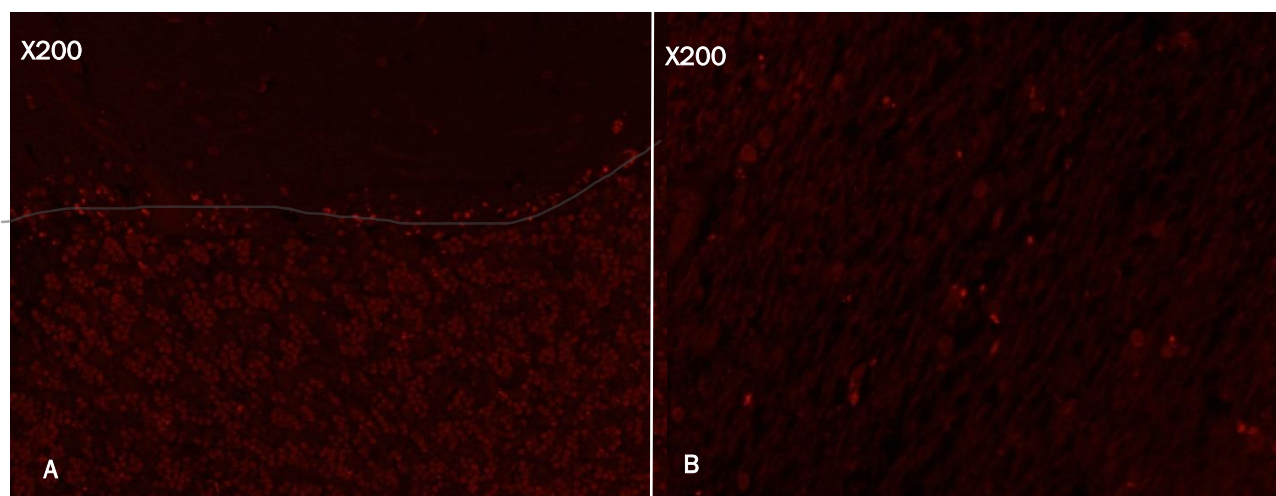


Figura 11. Patrones de fluorescencia en DFT.

11A) Corteza cerebelosa con sus tres capas y una banda fluorescente continua que separa granular y molecular a nivel de las Purkinje, como se observaba en controles.

11B) Sustancia blanca con fluorescencia similar a controles.

5. DISCUSIÓN

Debido a lo que se ha descrito previamente en cuanto a la desregulación del metabolismo lipídico en relación con la fisiopatología de la EA, nos ha llevado a cuestionarnos si pudieran asociarse estos cambios también a otras enfermedades neurodegenerativas.

La búsqueda de variaciones en la distribución y / o morfología de los acúmulos lipídicos con respecto al patrón de acumulación observado en pacientes sanos en relación con la neurodegeneración más allá de la EA es algo novedoso, por lo que la bibliografía previa al respecto resulta francamente escasa. Por ello, esta discusión básicamente se ha centrado en aquellos estudios en individuos afectados de EA vinculando alteraciones del metabolismo de los lípidos con el mecanismo de neurodegeneración y neuroinflamación. Se trata de un primer estudio preliminar que trata de profundizar en nuevas hipótesis a nivel metabólico que confirmen el papel que ejerce la neuroglía en el proceso neurodegenerativo.

Se ha elegido el cerebelo como región encefálica para este estudio porque a pesar de no ser la región diana de muchas de estas enfermedades aquí tratadas, todas ellas acaban con afectación cerebelar en su progresión a la totalidad del SNC. Además de que ha sido propuesta como un área clave para detectar la neuroinflamación (38) .

Analizando en primer lugar estudios sobre el daño que produce la expresión del genotipo de la ApoE4 en los oligodendrocitos, ya se ha visto, tanto una alteración en su contenido lipo-proteico con un aumento de lípidos en las vainas de mielina, como una disminución en el número de esta población glial. En esa investigación se aplicaba una tinción lipofílica, *fluoromielina* que tiene especificidad de unión por las grasas localizadas en la vaina de mielina, así como un protocolo de inmunohistoquímica frente a las cuatro proteínas que constituyen principalmente esta estructura oligodendrocitaria (MBP, MAG, PLP y MOG). En ese artículo concluyen la existencia de un mayor número de áreas positivas a *fluoromielina* y un menor número de aquellas con tinción específica frente a MOG en los ratones que expresan el gen ApoE humano (31).

En relación con lo encontrado en las muestras de pacientes afectados de EA en este trabajo, el aumento de fluorescencia en la sustancia blanca, junto con una menor correlación de la misma con los núcleos celulares, sugerirían resultados en la misma línea que en el estudio anterior. Por un lado, la mayor fluorescencia se justificaría por un incremento en los lípidos dentro de la vaina de mielina, mientras que su menor asociación con los núcleos de los oligodendrocitos quedaría justificada por su disminución en número.

En lo que se refiere a la sustancia gris, y en relación con el proceso neurodegenerativo que comparten todas las enfermedades aquí estudiadas, está totalmente aceptada la asociación con astrogliosis y activación microglial. El depósito de proteínas anómalas en el SNC provoca una sobre-activación del sistema inmune local formado esencialmente por ambas poblaciones gliales, que cambian tanto su morfología como su funcionalidad, dando lugar a la denominada “gliosis reactiva” descrita en estudios previos usando protocolos inmunohistoquímicos específicos como es el GFAP, en el caso de los astrocitos (39,40). De hecho, esta astrogliosis ha sido localizada predominantemente en los alrededores de las neuronas de Purkinje, células que parecen ser las más afectadas por la neurodegeneración a nivel del cerebelo en enfermedades priónicas, modelo de estudio de las proteinopatías (41). Concretamente, se hace una descripción de la disposición astrocitaria en forma de red perineuronal, mostrándose los astrocitos reactivos e hipertróficos densamente empaquetados en esta área (42) Esta distribución nos recuerda a la banda fluorescente que encontramos localizada en la misma zona y con una disposición similar en todas las muestras tratadas en este trabajo, lo que nos hace plantearnos si la fluorescencia puede estar emitida por astrocitos reactivos. Su reactividad sería en cada caso justificada por un lado, por la neurodegeneración de los pacientes enfermos y por otro, por el proceso de envejecimiento de los controles que poseen en su totalidad una edad avanzada.

Fue a partir de 2019, año en torno al que se publicaron estos artículos, cuando se vio que la neuroglía también sufría cambios en el proceso neurodegenerativo de otras enfermedades que no fueran las priónicas. Todas las enfermedades estudiadas en este trabajo comparten la acumulación de proteínas que presentan plegamientos anómalos en el medio tanto extracelular como intracelular, resultando patológicas. Estos acúmulos proteicos son señalados por diferentes investigadores como causantes de la cascada de acontecimientos de la activación glial y consecuente neuroinflamación que ello provoca (10).

En concreto, los estudios sobre EA que relacionan la activación neuroglial con la disrupción de la homeostasis lipídica sugieren como posible causa de activación inmunológica el aumento del contenido de colesterol extracelular en pacientes que poseen la isoforma E4 de la proteína ApoE. Además del colesterol extracelular, se sabe que los depósitos de β -amiloide (placas de amiloide) aumentan, pudiendo servir también como interruptor para la producción

de citocinas inflamatorias por parte de la microglía, que activa de manera simultánea a los astrocitos (30, 31, 32). Si recordamos, los astrocitos presentes en estos pacientes tienen mayor contenido en lípidos intracelulares y un cambio en su fenotipo a neurotóxico supone alteraciones en su metabolismo que pueden aumentar este depósito al volverse células con un funcionamiento menos fisiológico. Este argumento viene apoyado porque en este nuevo estado de activación ya se han visto reguladas a la alta enzimas para la lipogénesis en microglía (44), además de un aumento en la secreción en astrocitos de lipopartículas unidas a ApoE con un contenido lipídico distinto a las que se secretan en su forma no reactiva y que tienen mayor neurotoxicidad por su mayor contenido en ácidos grasos saturados de cadena larga y fosfatidilcolina (10).

Toda esta argumentación nos lleva a concluir que en un encéfalo en neurodegeneración donde hay un estado neuroinflamatorio concomitante puede verse alterada, como causa o como consecuencia de la neuroinflamación, el metabolismo lipídico de las células que protagonizan este proceso. Un ejemplo de este desacoplamiento sería el que produce la expresión de ApoE4, que puede servir de reflejo de lo que estamos exponiendo, siendo uno de los causantes principales del inicio de la cascada de acontecimientos que culmina en la EA (Figura 12). Según este esquema, las neuronas son incapaces de formar vesículas para almacenar los ácidos grasos que contienen y transportarlos hacia el astrocito, lo que aumenta la lipotoxicidad en su interior y genera daño neuronal. Por otro lado, los astrocitos tienen menor capacidad de procesar los ácidos grasos, apareciendo acúmulos de los mismos en forma de vesículas en su interior.

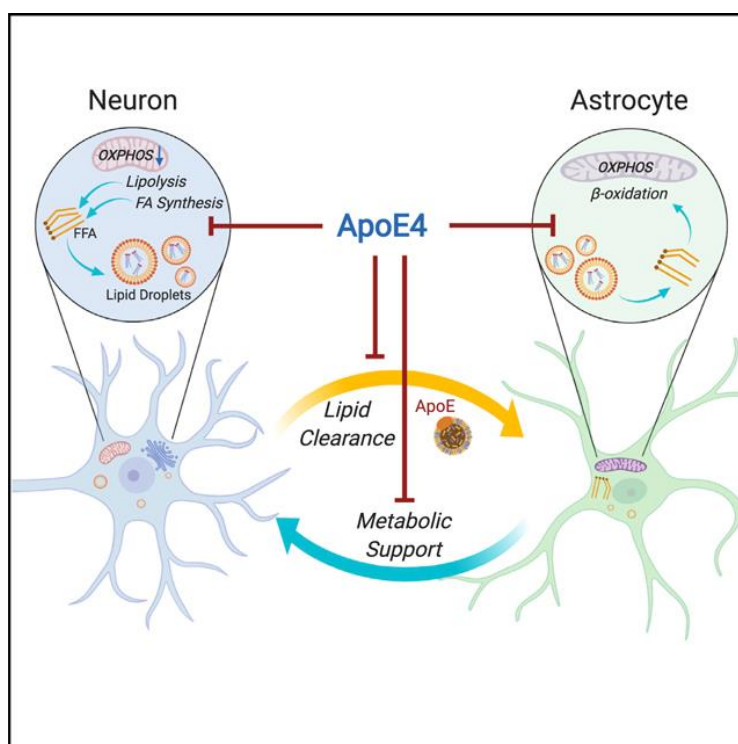


Figura 12: Consecuencias en el metabolismo lipídico de astrocito-neurona de la expresión de ApoE4 (12).

Ya se había hablado previamente de la lipotoxicidad como causa o consecuencia de neurodegeneración. Concretamente, el acúmulo de ácidos grasos en forma de vesículas en el interior de las células gliales como consecuencia de la disfunción mitocondrial o de aumento de especies reactivas al oxígeno (ROS) en los tejidos. La suma del depósito de ácidos grasos en forma de vesículas en el interior de las células de la glía, evidenciado también

en este estudio, y el aumento de ROS, puede llevar a la peroxidación lipídica y al inicio de daño neuronal (neurodegeneración) (43) . Cabe mencionar que las gotas lipídicas, en este caso, se encontraban previas a la aparición de cualquier otro signo histológico o clínico de neurodegeneración, por lo que la prevención de su formación podría convertirse en una potencial diana terapéutica frente a las enfermedades neurodegenerativas.

En otro estudio, se vieron gotas lipídicas en la microglía asociadas al proceso de envejecimiento del SNC. La microglía que contenía estas vesículas tenía menor capacidad de fagocitosis, producía un mayor número de citocinas inflamatorias y ROS, a la vez que variaba su transcriptoma desencadenando cambios en su metabolismo promoviendo y perpetuando el estado inflamatorio y degenerativo (44).

Considerando lo anteriormente expuesto en la bibliografía consultada, que asocia las alteraciones en los depósitos lipídicos y los desórdenes neurodegenerativos, y lo descrito en los resultados de este trabajo, se podría lanzar como primera conclusión que hay una relación justificable entre los mecanismos neurodegenerativos y cambios en el metabolismo lipídico. Este hecho hace que hayamos podido encontrar una alteración de la acumulación lipídica a nivel de cerebelo en otras enfermedades neurodegenerativas, aparte de EA, no estudiadas hasta la fecha.

El cambio morfológico en la banda fluorescente observada en la capa de Purkinje, que disminuye su continuidad en las muestras de enfermedades neurodegenerativas, podría ser debido al proceso de neurodegeneración a este nivel, tal y como se ha evidenciado en estudios utilizando las enfermedades priónicas como modelo de patología neurodegenerativa. Precisamente rodeando estas neuronas se observa una llamativa vacuolización perineuronal (41) y también son estas células de Purkinje donde se ha demostrado un aumento de la expresión de diversos marcadores pro-inflamatorios y una afectación de la neurodegeneración más marcada provocando su muerte (4, 45,46). Como consecuencia de este proceso degenerativo en esta capa, tampoco se visualizarían vesículas lipídicas, perdiendo la continuidad visual.

Por otro lado, por su localización próxima a las células de Purkinje, las células que captaban la fluorescencia con gotas lipídicas en su citoplasma en la zona de la capa granular más cercana a las neuronas de Purkinje, tanto en la EA, como en la EMN y la EP, sugieren ser células gliales. Estudios previos publicados ya han demostrado cómo aumenta el marcador específico frente a astrocitos, GFAP, en determinadas patologías que cursan con neurodegeneración a este nivel de la región cerebelar (47). No sorprende encontrar astrocitos reactivos en un lugar identificado como foco neurodegenerativo, pero hace falta profundizar en las causas por las que estos posibles astrocitos acumulan lípidos en su interior cuando cambian su expresión genómica en un ambiente proinflamatorio. La clave para entenderlo puede estar en la EA y el papel que tienen en esta patología los lípidos en el interior de las células gliales como activadores de la cascada de acontecimientos que culminan en la neurodegeneración clásica de la enfermedad.

Por ello, otra de las conclusiones principales que pueden extraerse a partir de los resultados de este trabajo es que el astrocito reactivo se confirma como célula clave en la evolución de la neurodegeneración. En concreto, este trabajo se enfocaría en las alteraciones del depósito lipídico en esta población glial como posible causa o consecuencia del fallo en la homeostasis y consecuente muerte neuronal característica del proceso neurodegenerativo. Así, se abren nuevos caminos para seguir investigando acerca de los cambios metabólicos que se producen cuando el astrocito se activa.

Lo que de nuevo se reafirma es que la activación glial, causante de la producción de moléculas que resultan altamente tóxicas para las neuronas y que perpetúan el estado inflamatorio local desencadenando una consecución de sucesos como la ruptura de la BHE o la falta de eficacia de la inmunidad innata local, desemboca irremediabilmente en la neurodegeneración. A su vez, esta neurodegeneración lleva consigo cambios en el metabolismo lipídico que conllevan su depósito en dicho subtipo celular.

6. CONCLUSIONES

- La conclusión principal a la que se ha llegado en este trabajo es que los patrones de acumulación lipídica y en consecuencia, el metabolismo de lípidos, se ve alterado no sólo como había sido descrito en la EA, sino en todas las enfermedades neurodegenerativas aquí estudiadas excepto en la DFT.
- Las mayores diferencias en los patrones de acúmulos lipídicos han sido descritas a nivel de la capa de Purkinje. Este hallazgo concuerda con que estas neuronas, como ya había sido señalado, son las más afectadas en el cerebelo durante el proceso neurodegenerativo.
- Las lesiones histopatológicas características de las enfermedades priónicas como son la espongiosis y la vacuolización intraneuronal, no evidencian asociación con el depósito lipídico, por lo tanto, con la desregulación del metabolismo de lípidos.
- Una de las observaciones realizadas en la mayoría de las patologías incluidas sugiere que las células que acumulan vesículas lipídicas en la zona de la capa granular próxima a la capa de Purkinje, son células de la glía activadas, reafirmando el protagonismo de la población glial en la neurodegeneración.

En base a la revisión bibliográfica realizada para explicar los resultados de nuestro estudio también podemos concluir que:

- Los lípidos son capaces de, por sí mismos, causar muerte neuronal por un proceso denominado lipoapoptosis. Las lipopartículas neurotóxicas que causan este daño son secretadas por astrocitos reactivos, lo que confirmaría un cambio en el metabolismo lipídico tras la activación astrocitaria.
- La deposición lipídica puede actuar como causa de activación de la neuroinflamación, como en el caso de la EA en pacientes con genotipo ApoE4, o como consecuencia del ambiente inflamatorio y degenerativo local.

BIBLIOGRAFÍA

1. Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2017;9(7):a028035. Available from: <http://cshperspectives.cshlp.org/content/9/7/a028035.full>
2. Chi H, Chang HY, Sang TK. Neuronal Cell Death Mechanisms in Major Neurodegenerative Diseases. Int J Mol Sci. 2018;19(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30304824>
3. Moisés Garcés Ayuba. Estudio morfológico sobre las alteraciones neurogliales en las enfermedades priónicas y prion-like. Available from: <http://zaguan.unizar.es>
4. Kempuraj D, Thangavel R, Natteru PA, Selvakumar GP, Saeed D, Zahoor H, et al. Neuroinflammation Induces Neurodegeneration. J Neurol Neurosurg Spine. 2016;1(1). Available from: </pmc/articles/PMC5260818/>
5. Koutsodendris N, Blumenfeld J, Agrawal A, Traglia M, Grone B, Zilberter M, et al. Neuronal APOE4 removal protects against tau-mediated gliosis, neurodegeneration and myelin deficits. Nature Aging 2023;3(3):275–96. Available from: <https://www.nature.com/articles/s43587-023-00368-3>
6. Yen JHJ, Yu ICI. The role of ApoE-mediated microglial lipid metabolism in brain aging and disease. Immunometabolism (Cobham). 2023;5(1):e00018. Available from: </pmc/articles/PMC9869962/>
7. Lawrence JM, Schardien K, Wigdahl B, Nonnemacher MR. Roles of neuropathology-associated reactive astrocytes: a systematic review. Acta Neuropathol Comm 2023;11(1):1–28. Available from: <https://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-023-01526-9>
8. Singh D. Astrocytic and microglial cells as the modulators of neuroinflammation in Alzheimer's disease. J Neuroinflamm. 2022;19(1):1–15. Available from: <https://jneuroinflammation.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12974-022-02565-0>
9. Afridi R, Kim JH, Rahman MH, Suk K. Metabolic Regulation of Glial Phenotypes: Implications in Neuron-Glia Interactions and Neurological Disorders. Front Cell Neurosci. 2020;14:20. Available from: <https://europepmc.org/articles/PMC7026370>
10. Guttenplan K. Why do neurons die? Science 2022;378(6619):485. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.ade2129>
11. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. Cell. 2019;179(2):312. Available from: </pmc/articles/PMC6778042/>
12. Qi G, Mi Y, Shi X, Gu H, Brinton RD, Yin F. ApoE4 Impairs Neuron-Astrocyte Coupling of Fatty Acid Metabolism. Cell Rep. 2021;34(1):108572. Available from: </pmc/articles/PMC7837265/>
13. Victor MB, Leary N, Luna X, Meharena HS, Scannail AN, Bozzelli PL, et al. Lipid accumulation induced by APOE4 impairs microglial surveillance of neuronal-network activity. Cell Stem Cell. 2022 Aug 4;29(8):1197-1212.e8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35931030/>
14. Dickson DW. Parkinson's Disease and Parkinsonism: Neuropathology. Cold Spring Harb Perspect Med.2012;2(8):a009258. Available from: <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/2/8/a009258.full>
15. Dickson DW. Neuropathology of Parkinson disease. Parkinsonism Relat Disord. 2018;46:S30–3.
16. Lewis MM, Galley S, Johnson S, Stevenson J, Huang X, McKeown MJ. The Role of the Cerebellum in the Pathophysiology of Parkinson's Disease. Can J Neurol Sci. 2013;40(3):299. Available from: </pmc/articles/PMC6939223/>

17. Mackenzie IRA, Neumann M. Molecular neuropathology of frontotemporal dementia: insights into disease mechanisms from postmortem studies. *J Neurochem.* 2016;138:54–70. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/jnc.13588>
18. Josephs KA, Hodges JR, Snowden JS, MacKenzie IR, Neumann M, Mann DM, et al. Neuropathological background of phenotypical variability in frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* 2011;122(2):137–53. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-011-0839-6>
19. Ironside JW, Head MW. Neuropathology and Molecular Biology of Variant Creutzfeldt-Jakob Disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2004;284:133–59. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-08441-0_6
20. Ferrer I. Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebellum.* 2002;1(3):213–22. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1080/14734220260418448>
21. Ironside JW. Review: Creutzfeldt-Jakob Disease. *Brain Pathol.* 1996;6(4):379–88. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3639.1996.tb00869.x>
22. Simon D, Seznec H, Gansmuller A, Carelle N, Weber P, Metzger D, et al. Friedreich Ataxia Mouse Models with Progressive Cerebellar and Sensory Ataxia Reveal Autophagic Neurodegeneration in Dorsal Root Ganglia. *J Neurosci.* 2004;24(8):1987–95. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/24/8/1987>
23. Selvadurai LP, Harding IH, Corben LA, Georgiou-Karistianis N. Cerebral abnormalities in Friedreich ataxia: A review. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018;84:394–406.
24. Tanaka F, Ikenaka K, Yamamoto M, Sobue G. Neuropathology and omics in motor neuron diseases. *Neuropathology.* 2012;32(4):458–62. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1440-1789.2011.01281.x>
25. Chipika R, Mulkerrin G, Pradat PF, Murad A, Ango F, Raoul C, et al. Cerebellar pathology in motor neuron disease: neuroplasticity and neurodegeneration. *Neural Regen Res.* 2022;17(11):2335. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/39120698/>
26. Vonsattel JPG, Keller C, Pilar Amaya M del. Neuropathology of Huntington's Disease. *Hand Clin Neurol.* 2008;89:599–618.
27. Walker FO. Huntington's disease. *Lancet.* 2007;369(9557):218–28.
28. Franklin GL, Camargo CHF, Meira AT, Lima NSC, Teive HAG. The Role of the Cerebellum in Huntington's Disease: a Systematic Review. *Cerebellum.* 2021;20(2):254–65. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12311-020-01198-4>
29. Manual MSD. Prionopatía variable sensible a proteasas (Variably Protease-Sensitive Prionopathy [VPSP]) - Enfermedades cerebrales, medulares y nerviosas. 2023. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-es/hogar/enfermedades-cerebrales,-medulares-y-nerviosas/enfermedades-por-priones/prionopat%C3%ADa-variable-sensible-a-proteasas-variably-protease-sensitive-prionopathy-vpspr>
30. Jeong W, Lee H, Cho S, Seo J. ApoE4-Induced Cholesterol Dysregulation and Its Brain Cell Type-Specific Implications in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Mol Cells.* 2019;42(11):739. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/316883979/>
31. Mok KKS, Yeung SHS, Cheng GWY, Ma IWT, Lee RHS, Herrup K, et al. Apolipoprotein E ϵ 4 disrupts oligodendrocyte differentiation by interfering with astrocyte-derived lipid transport. *J Neurochem.* 2023; 165(1):55-75. Available from: doi: 10.1111/jnc.15748.

32. Yen JHJ, Yu ICI. The role of ApoE-mediated microglial lipid metabolism in brain aging and disease. *Immunometabolism*. 2023;5(1):e00018. Available from: https://journals.lww.com/immunometabolism/Fulltext/2023/01000/The_role_of_ApoE_mediated_microglial_lipid.7.aspx
33. Koutsodendris N, Blumenfeld J, Agrawal A, Traglia M, Grone B, Zilberter M, et al. Neuronal APOE4 removal protects against tau-mediated gliosis, neurodegeneration and myelin deficits. *Nature Aging* 2023;3(3):275–96. Available from: <https://www.nature.com/articles/s43587-023-00368-3>
34. Calvo Baltanás, F. Estudio de la Pre-neurodegeneración y Neurodegeneración de las células de Purkinje en un modelo de ataxia cerebelosa: el ratón mutante pcd. 2009; Available from: <https://gredos.usal.es/handle/10366/76228>
35. Buckner RL. The cerebellum and cognitive function: 25 years of insight from anatomy and neuroimaging. *Neuron*. 2013;80(3):807–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24183029>
36. Ross, M., Pawlina, W. (2015). *Histología Texto y Atlas: Correlación con biología molecular y celular*. 7 ed. Barcelona, España: Wolters Kluwer 2015. 1052 p.
37. *Researchgate*. Esquema tridimensional de la corteza cerebelosa. Download Scientific Diagram. Available from: https://www.researchgate.net/figure_fig3_268360900
38. Lyoo CH, Ikawa M, Liow JS, Zoghbi SS, Morse CL, Pike VW, et al. Cerebellum Can Serve As a Pseudo-Reference Region in Alzheimer Disease to Detect Neuroinflammation Measured with PET Radioligand Binding to Translocator Protein. *J Nuc Med*. 2015;56(5):701–6. Available from: <https://jnm.snmjournals.org/content/56/5/701>
39. Garcés M, Guijarro MI, Vargas A, Badiola JJ, Monzón M. Neuroglial patterns are shared by cerebella from prion and prion-like disorder affected patients. *Mech Ageing Dev*. 2019;184. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31689427>
40. Ferrer I. Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol*. 2017;27(5):645–74. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28804999>
41. Sarasa R, Junquera C, Toledano A, Badiola JJ, Monzón M. Ultrastructural changes in the progress of natural Scrapie regardless fixation protocol. *Histochem Cell Biol*. 2015;144(1):77–85. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00418-015-1314-6>
42. Hernández RS, Sarasa R, Toledano A, Badiola JJ, Monzón M. Morphological approach to assess the involvement of astrocytes in prion propagation. *Cell Tissue Res*. 2014;358(1):57–63. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00441-014-1928-3>
43. Liu L, Zhang K, Sandoval H, Yamamoto S, Jaiswal M, Sanz E, et al. Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. *Cell*. 2015;160(0):177. Available from: <https://pmc/articles/PMC4377295/>
44. Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B, Haney MS, et al. Lipid droplet accumulating microglia represent a dysfunctional and pro-inflammatory state in the aging brain. *Nat Neurosci*. 2020;23(2):194. Available from: <https://pmc/articles/PMC7595134/>
45. Childs R, Gamage R, Münch G, Gyengesi E. The effect of aging and chronic microglia activation on the morphology and numbers of the cerebellar Purkinje cells. *Neurosci Lett*. 2021 Apr 23;751:135807.
46. Kyuhou SI, Kato N, Gemba H. Emergence of endoplasmic reticulum stress and activated microglia in Purkinje cell degeneration mice. *Neurosci Lett*. 2006 Mar 27;396(2):91–6.
47. Hernández RS, Sarasa R, Toledano A, Badiola JJ, Monzón M. Morphological approach to assess the involvement of astrocytes in prion propagation. *Cell Tissue Res*. 2014 ;358(1):57–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24931403>