EVALUACIÓN DE LAS NEUROTROFINAS EN LOS MODELOS NATURAL Y EXPERIMENTAL DE SCRAPIE

Barrio, T.[1], Otero, A.[1], Garcés, M.[1], García, M.[1], Garza, M.C.[1], Guijarro, I.M.[1], López-Pérez, O.[1], Manzano, M.D.[1], Raksa, H.[1]
[1]Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes. Universidad de Zaragoza. C/Miguel Servet, 177. 50013 (Zaragoza). e-mail: aliotg@unizar.es

INTRODUCCIÓN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por la acumulación de la isoforma patológica (PrP^{Sc}) de la proteína prión celular (Prusiner, 1982). La PrP^{Sc} se acumula fundamentalmente en el tejido nervioso, induciendo la muerte neuronal y la aparición de vacuolas. Esta neurodegeneración progresiva se manifiesta como un conjunto de síntomas nerviosos que se instauran tras largos periodos de incubación. El scrapie ovino, como prototipo de las EET, ha sido ampliamente estudiado tanto en su hospedador natural como en modelos murinos transgénicos que expresan la PrP^{C} ovina.
Por otro lado, las neurotrofinas son un grupo de factores de crecimiento con funciones críticas en el sistema nervioso. Constituyen un grupo de proteínas, que incluye el factor de crecimiento neuronal (NGF), el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), y la neurotrofina 3 (NT-3), entre otros. Ejercen sus funciones a través de los receptores de membrana tirosina-quinasa TrkA, TrkB y TrkC, y el receptor $p75^{NTR}$.
En diversos estudios, tanto *in vitro* como *in vivo*, se ha evidenciado una relación entre la patogenia de las EET y las neurotrofinas (Bai et al., 2008). Por ejemplo, en ratones transgénicos bovinos inoculados con encefalopatía espongiforme bovina se observó una correlación entre las zonas del encéfalo con mayor cambio espongiforme, astrocitosis y depósito de PrP^{Sc} y las áreas con mayor expresión de $p75^{NTR}$ (Marco-Salazar et al., 2014).
El objetivo del presente estudio es mapear las neurotrofinas mediante técnicas inmunohistoquímicas en ratones transgénicos inoculados y en ovino naturalmente infectado con scrapie. Esto permitirá comparar ambos modelos y confirmar la correlación entre la expresión de las neurotrofinas y las lesiones asociadas a enfermedad priónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización de este estudio, se emplearon muestras de hipocampo y médula oblongada de ovejas naturalmente infectadas con scrapie procedentes de diversos focos de la enfermedad en Aragón, y de cerebro completo de ratones experimentalmente inoculados con homogenizados de cerebro de ovejas afectadas. En ambos casos, se introdujeron muestras de animales no infectados como control de experimento. El uso de ratones en este experimento fue aprobado por el Comité Ético para Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (número de permiso: PI19/14).
Primero se realizó un estudio preliminar con muestras de 3 ovinos y 2 ratones para evaluar la distribución de los 7 marcadores. Posteriormente se amplió el estudio con muestras de 3 ovejas y 2 ratones adicionales; la valoración de estas muestras se encuentra en proceso.
Se aplicaron técnicas inmunohistoquímicas para mapear las neurotrofinas en los tejidos seleccionados. Para ello, se utilizaron anticuerpos monoclonales para detectar las distintas neurotrofinas, y las uniones se revelaron empleando el sistema EnVision+ (Dako).
Adicionalmente, se emplearon técnicas de microscopía confocal para valorar la colocalización de los depósitos de PrP^{Sc} y $p75^{NTR}$. Los anticuerpos primarios empleados fueron L42 (R-Biopharm), que detecta la proteína prión ovina, y un anticuerpo monoclonal anti-$p75^{NTR}$ (Abcam). El proceso se reveló empleando anticuerpos secundarios fluorescentes Alexa 594 y Alexa 488 (Invitrogen).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la realización de la técnica inmunohistoquímica para la detección de NGF en las muestras procedentes de ratones (modelo experimental) y ovejas (modelo natural) se observaron patrones muy similares. En los animales control no infectados se observó un marcaje del citoplasma y núcleo de las neuronas, así como del neuropilo, localizado en diversas áreas del encéfalo. En el caso de los animales infectados, si bien el marcaje de esta neurotrofina en el neuropilo fue más débil en determinadas zonas, se observó un patrón similar.

El patrón de inmunotinción de BDNF fue muy similar a lo observado con el marcador NGF, no existiendo diferencias claras entre los animales sanos e infectados.

En ratones, en las muestras positivas a priones se detectó una mayor intensidad de marcaje intraneuronal para NT-3 que en las controles, aunque en general no se observaron grandes diferencias entre los dos tipos de animales. En el modelo ovino se observó una mayor intensidad de marcaje para NT-3 que en el modelo experimental, viéndose, al igual que con NGF, una mayor intensidad de tinción del neuropilo en las ovejas sanas.

Con respecto a la inmunodetección de los receptores se observó que el inmunomarcaje para el receptor TrkA fue poco específico en las muestras de ratones, detectándose depósitos suaves en el neuropilo y un marcaje débil y de detección variable en el interior de las neuronas. En el caso de las ovejas se obtuvieron resultados similares a lo observado en ratones.

En el caso del receptor TrkB, se observó una inmunotinción de la membrana neuronal en el modelo murino. Este marcaje de la membrana de las neuronas no se observó en las muestras ovinas; sin embargo, sí se detectaron depósitos de aspecto granular en el citoplasma neuronal (Figura 1A y B).

Por otra parte, cuando se realizó la técnica inmunohistoquímica para la detección del receptor TrkC se apreció una tinción intensa de las células de Purkinje en las muestras de cerebelo del modelo murino infectado. Curiosamente, esta reactividad frente al receptor TrkC en las células de Purkinje se observó sólo en las ovejas sanas (Figura 1C y D).

Finalmente, para el marcador $p75^{NTR}$ se observó un patrón de inmunotinción característico en el caso de los ratones control: un marcaje muy evidente de los astrocitos que contrasta con un marcaje leve de las neuronas. En el caso de los ratones infectados el patrón fue similar, si bien el marcaje de las neuronas fue mayor. En el caso de las ovejas, tanto infectadas como controles, se observó marcaje neuronal; sin embargo, no se detectó el claro marcaje astrocítico que se observó en el modelo experimental.

Por otro lado, en el estudio de microscopía confocal se observó un patrón similar al descrito en la inmunohistoquímica para el marcador $p75^{NTR}$. En ciertas áreas pudo verse cierta colocalización entre la proteína prión patológica y este marcador.

En general, la expresión de las neurotrofinas y sus receptores es fundamentalmente neuronal, salvo para el receptor $p75^{NTR}$ que también se expresa en células gliales. Con respecto a las diferencias observadas entre animales infectados y controles, que podrían llevar a la identificación de alguna de estas moléculas como biomarcadores de la enfermedad, nuestros resultados coinciden parcialmente con lo observado en estudios anteriores (Marco-Salazar et al., 2014) pero se requiere continuar este estudio con mayor número de muestras para extraer conclusiones significativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bai Y, et al., 2008. p75(NTR) activation of NF-kappa B is involved in PrP106-126-induced apoptosis in mouse neuroblastoma cells. Neurosci Res. SEP; 62(1):9-14.
- Marco-Salazar P, et al., 2014. Mapping of Neurotrophins and their Receptors in the Adult Mouse Brain and their Role in the Pathogenesis of a Transgenic Murine Model of Bovine Spongiform Encephalopathy. J Comp Pathol; 150(4):449-462.
- Prusiner S. 1982. Novel Proteinaceous Infectious Particles Cause Scrapie. Science;216(4542):136-144.

Agradecimientos: Los autores quieren agradecer a Sonia Gómez, Esther Blasco y María de la Sierra Espinar por su apoyo técnico.

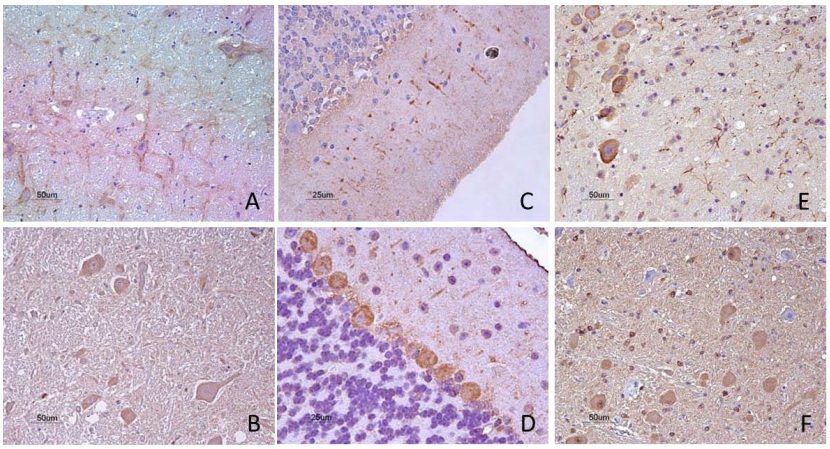


***Figura 1**. Patrones de depósito de neurotrofinas en distintas muestras. (A y B) Patrones de depósito de TrkB perineuronal en ratón (A) e neuronal intracitoplasmático en oveja (B). (C y D) Patrones de depósito de TrkC con ausencia de marcaje en neuronas de Purkinje en ratón control (C) y con presencia de dicho marcaje en ratón infectado (D). (E y F) Patrones de depósito de p75NTR con marcaje astrocítico en ratón (E) y ausencia de este marcaje en oveja (F).*

ASSESSMENT OF NEUROTROPHINS IN NATURAL AND EXPERIMENTAL MODELS OF SCRAPIE

ABSTRACT: Neurotrophins are growth factors with a critical role the nervous tissue of mammals. The group includes the nerve growth factor (NGF), the brain-derived neurotrophic factor (BDNF), the neurotrophin 3 (NT-3), the tyrosine-kinase transmembrane receptors TrkA, TrkB and TrkC, and the p75 neurotrophin receptor ($p75^{NTR}$). Neurotrophins are important in the development of the nervous system and its maintenance during adult life. In several studies, a relation between neurotrophins and prion diseases has been demonstrated.

In this study, immunohistochemical approaches were used to analyze the distribution of neurotrophins in the brain of scrapie-infected sheep and transgenic mice and to assess the relation between neurotrophins and prion protein deposits.

In our experiment, neurotrophins predominantly displayed an intracytoplasmic neuronal staining, while transmembrane receptors were mapped at the membranes and the neuropil. $p75^{NTR}$ also showed a conspicuous, branched glial pattern that probably corresponded to astrocytes.

In the ovine model, the labelling pattern mirrored that of the murine model for markers NGF, BDNF, NT-3 and TrkA, while for TrkB different patterns were disclosed. TrkC showed opposite stainings of Purkinje cells, and the astrocytic labeling of $p75^{NTR}$ was mouse-specific. Confocal microscopy yielded no significant results. Further studies are being carried on to verify our results and to assess the validity of these neurotrophins as biomarkers of scrapie.

Keywords*:* sheep scrapie, pathogenesis, neurotrophins.