



**Trabajo de Fin de Grado**

**Grado en Medicina**

**Facultad de Ciencias de la Salud**

**Universitat Jaume I**

**Caracterización de BCAS1 como marcador de una subpoblación de oligodendrocitos premielinizantes en el cerebro humano y su potencial trascendencia clínica en patología desmielinizante**

**Autor: Emma Meseguer Beltrán**

Tutor: Vicente Herranz Pérez

Unidad Predepartamental de Medicina

Curso 2020-2021

## **TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA**

**EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A** hace constar su **AUTORIZACIÓN** para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y **CERTIFICA** que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

**TÍTULO del TFG:** Caracterización de BCAS1 como marcador de una subpoblación de oligodendrocitos premielinizantes en el cerebro humano y su potencial trascendencia clínica en patología desmielinizante.

**ALUMNO/A:** Emma Meseguer Beltrán

**DNI:** 47475370N

**PROFESOR/A TUTOR/A:** Vicente Herranz Pérez

Castelló de la Plana, 1 de junio de 2021



Fdo (Tutor/a): Vicente Herranz Pérez



## Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor, Vicente Herranz, por toda su dedicación, esfuerzo y apoyo a lo largo de este proyecto. Soy afortunada por haber compartido esta etapa contigo y por haber recibido una pequeña parte de tus conocimientos.

A mi pequeña, pero a la vez tan grande hermana, sabes que eres un referente en muchos aspectos de mi vida.

A mis padres, sinónimo de incondicionalidad. Sin vuestro apoyo no podría estar escribiendo estas líneas. Espero que logros como éste compensen, aunque sea solo un rato, algunos de los quebraderos de cabeza que os doy a menudo.

A Nieves: estar perdida en el camino hizo que te encontrara y, desde entonces, te has convertido en mi brújula. Me ayudas a orientarme ante los contratiempos del viaje, a levantar la cabeza y disfrutar del paisaje. Gracias por recordarme el poder de la perseverancia. Gracias por tu compartir.

A Irene, lamento no haberte conocido antes y a Noemí; con vosotras la frase *“la amistad es un tesoro”* cobra sentido.

Y, sobre todo, muchas gracias a la generosidad de todos los donantes que han colaborado en este proyecto y lo han hecho posible. Vuestra esperanza depositada hace que nuestra labor tenga sentido.

# Índice

|   |            |
|---|------------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....  | <b>V</b>   |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....   | <b>VI</b>  |
| <b>ABREVIATURAS</b> .....   | <b>VII</b> |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>IX</b>  |
| <b>EXTENDED SUMMARY</b> .....   | <b>XI</b>  |
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>1</b>   |
| 1.1 OLIGODENDROCITOS Y MIELINIZACIÓN .....  | 1          |
| 1.2 DIFERENCIACIÓN DEL LINAJE OLIGODENDROGLIAL .....  | 3          |
| 1.2.1 <i>Etapas madurativas</i> .....   | 3          |
| 1.2.2 <i>Regulación del proceso de determinación y maduración oligodendroglial</i> .....  | 5          |
| 1.3 OLIGODENDROGÉNESIS DURANTE EL DESARROLLO .....  | 8          |
| 1.5 OLIGODENDROGÉNESIS EN EL CEREBRO ADULTO .....   | 10         |
| 1.6 BCAS1 COMO MARCADOR DEL LINAJE OLIGODENDROGLIAL .....   | 12         |
| 1.7 IMPLICACIÓN DE LOS OL EN LA FISIOPATOLOGÍA DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE .....  | 13         |
| <b>2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....   | <b>17</b>  |
| <b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....  | <b>18</b>  |
| 3.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS .....   | 18         |
| 3.2 DISEÑO EXPERIMENTAL .....   | 20         |
| 3.3 DETECCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA .....  | 20         |
| 3.4 DETECCIÓN POR INMUNO-ORO .....  | 21         |
| 3.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN .....  | 21         |
| 3.5 CUANTIFICACIÓN Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | 23         |
| <b>4. RESULTADOS</b> .....  | <b>24</b>  |
| 4.1 ESTUDIO DE LA DINÁMICA TEMPORAL DE LA POBLACIÓN CELULAR BCAS1 <sup>+</sup> EN MUESTRAS<br>ADULTAS Y PEDIÁTRICAS DE TEJIDO CEREBRAL HUMANO .....   | 24         |
| 4.2 CARACTERIZACIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL LINAJE OLIGODENDROGLIAL Y DE LA POBLACIÓN<br>BCAS1 <sup>+</sup> .....  | 26         |
| 4.3 CUANTIFICACIÓN DE LA DENSIDAD CELULAR DE LA POBLACIÓN BCAS1 <sup>+</sup> EN TEJIDO CEREBRAL<br>PEDIÁTRICO Y ADULTO SANO Y PRESENCIA DE CÉLULAS BCAS1 <sup>+</sup> EN MUESTRAS DE ESCLEROSIS<br>MÚLTIPLE ..... | 33         |
| <b>5. DISCUSIÓN</b> .....   | <b>35</b>  |
| 5.1 DINÁMICA DE LA MADURACIÓN DEL LINAJE OLIGODENDROGLIAL EN EL CEREBRO HUMANO ...  | 35         |
| 5.2 POBLACIÓN BCAS1 <sup>+</sup> EN EL CEREBRO HUMANO EN EDAD INFANTIL Y ADULTA .....   | 36         |
| 5.3 LIMITACIONES DEL ESTUDIO .....  | 37         |
| 5.4 CONCLUSIONES .....  | 38         |
| <b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....  | <b>39</b>  |

## Índice de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1:</b> Estructura de la mielina en el sistema nervioso central   | 2  |
| <b>Figura 2:</b> Etapas madurativas del linaje oligodendroglial  | 4  |
| <b>Figura 3:</b> Oleadas de generación del linaje oligodendroglial durante el desarrollo   | 9  |
| <b>Figura 4:</b> Organización de la ZV-SV del cerebro de ratón y humano adultos  | 11 |
| <b>Figura 5:</b> Esquema del planteamiento metodológico desarrollado   | 19 |
| <b>Figura 6:</b> Detección por inmunofluorescencia de diversos marcadores gliales  | 24 |
| <b>Figura 7:</b> Detección por inmunofluorescencia de marcadores específicos del linaje oligodendroglial en estadios de maduración intermedios                       | 25 |
| <b>Figura 8:</b> Detección por inmunofluorescencia de proteínas asociadas a la mielina características de oligodendrocitos maduros                                   | 26 |
| <b>Figura 9:</b> Detección por inmuno-oro de células progenitoras de oligodendrocitos NG2 <sup>+</sup> en la sustancia blanca humana de un donante de 6 años de edad | 27 |
| <b>Figura 10:</b> Detección por inmuno-oro de oligodendrocitos premielinizantes BCAS1 <sup>+</sup> en la sustancia blanca humana de un donante de 6 años de edad     | 29 |
| <b>Figura 11:</b> Detección por inmuno-oro de oligodendrocitos premielinizantes BCAS1 <sup>+</sup> en la sustancia blanca humana de un donante de 39 años de edad    | 30 |
| <b>Figura 12:</b> Detección por inmuno-oro de Olig2 en células del linaje oligodendroglial en la sustancia blanca humana de un donante en edad pediátrica de 9 años  | 31 |
| <b>Figura 13:</b> Detección por inmuno-oro de Olig2 en células del linaje oligodendroglial en la sustancia blanca humana de un donante de 44 años de edad            | 32 |
| <b>Figura 14:</b> Detección inmunohistoquímica de BCAS1 en la sustancia blanca de donantes pediátricos, adultos y en una paciente de esclerosis múltiple             | 34 |

## Índice de tablas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1:</b> Moléculas implicadas en la regulación del linaje oligodendroglial    | 7  |
| <b>Tabla 2:</b> Criterios de McDonald revisados en 2017 para el diagnóstico de la EM | 15 |
| <b>Tabla 3:</b> Sujetos de estudio   | 19 |
| <b>Tabla 4:</b> Lista de anticuerpos primarios usados                                | 22 |
| <b>Tabla 5:</b> Lista de anticuerpos primarios usados                                | 22 |

## Abreviaturas

AEP: Área entopeduncular anterior.

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero.

BCAS1: *Breast Cancer Breast carcinoma-amplified sequence 1*.

BMP: *Bone Morphogenetic Protein* (Proteínas morfogénicas óseas).

DAB: Diaminobenzidina.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol.

DTI: *Diffusion tensor imaging* (imagen de tensor de difusión).

CGE: Eminencia ganglinal caudal.

EGF: *Epidermal growth factor* (factor de crecimiento epidérmico).

EM: Esclerosis múltiple.

EMPP: Esclerosis múltiple primaria progresiva.

EMRR: Esclerosis múltiple remitente recurrente.

EMSP: Esclerosis múltiple secundaria progresiva.

GalC: Galactosilceramidasa o galactocerebrosidasa.

GFAP: *Glial fibrillary acidic protein* (proteína ácida fibrilar glial).

Hdac: Histonas mediadas por deacetilasas.

HLH: *Helix-loop-helix* (hélice-bucle-hélice).

LCR: Líquido cefalorraquídeo.

LGE: Eminencia ganglinal lateral.

MAG: *Myelin-associated glycoprotein* (glicoproteína asociada a mielina).

MBP: *Myelin basic protein* (proteína básica de la mielina).

MGE: Eminencia ganglinal medial.

MOG: *Myelin oligodendrocyte protein* (proteína oligodendroglial de la mielina).

NG2: *Chondroitin sulfate proteoglycan*.

NSC: *Neural stem cells* (células madre neurales).

OL: Oligodendrocito.

OLIG1: *Oligodendrocyte transcription factor 1*.

OLIG2: *Oligodendrocyte transcription factor 2*.

OPC: *Oligodendrocyte progenitor cells* (células progenitoras de oligodendrocitos).

PB: Tampón fosfato.

PBS: Tampón fosfato salino.

PDGFR $\alpha$ : *Platelet-derived growth factor receptor  $\alpha$*  (receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas  $\alpha$ ).

PET: Tomografía de emisión de positrones.

PFA: Paraformaldehído.

PLP: *Myelin proteolipid protein*.

PTA: Tampón fosfato-Triton X100-albúmina.

pre-OL: Preoligodendrocitos (OPC tardías).

RMN: Resonancia magnética nuclear.

SEM: Error estándar de la media.

SG: Semanas de gestación.

SNC: Sistema nervioso central.

T3: Triyodotironina.

VL: Ventrículo lateral.

VS: Vaso sanguíneo.

V-SVZ: *Ventricular-subventricular zone*.

ZSG: Zona subgranular del giro dentado.

ZV-SV: Zona ventricular-subventricular.

## Resumen

Los oligodendrocitos son células gliales presentes en el sistema nervioso central cuya principal función es la mielinización axonal. Además, en el cerebro adulto existe una población celular relativamente abundante que corresponde a células precursoras de oligodendrocitos (OPC), que se mantiene en un estado indiferenciado. Recientemente se ha descrito un nuevo marcador molecular, BCAS1, de función desconocida en el cerebro, que se expresa en una subpoblación oligodendrogliol circunscrita a estadios intermedios de maduración. El interés de dicho marcador radica, principalmente, a que es expresado por OPC premielinizantes, siendo relevante en el estudio de procesos como la remodelación de la mielina y la remielinización ante situaciones patológicas. Nuestro trabajo pretende llevar a cabo una caracterización descriptiva de la población celular definida por la expresión del marcador BCAS1 en el cerebro humano en etapas infantiles y adultas, tanto en tejido sano como de pacientes de esclerosis múltiple. Hipotetizamos que BCAS1 podría definir una subpoblación oligodendrogliol presente desde etapas posnatales hasta en el cerebro adulto, actuando como reservorio de OPC capaces de responder a necesidades de remodelado miélinico. Para abordar dicha hipótesis realizamos estudios de inmunofluorescencia, microscopía electrónica y cuantificación de la densidad celular de la población BCAS1-positiva en muestras de tejido cerebral de donantes en edad pediátrica y adulta. Nuestros resultados sugieren que la proteína BCAS1 se expresa en el cerebro humano en estadios madurativos intermedios del linaje oligodendrogliol, sin diferencias ultraestructurales, moleculares, ni en cuanto a densidad celular entre los estratos infantil y adulto comparados.

**Palabras clave:** oligodendrocitos, células precursoras de oligodendrocitos, zona ventricular-subventricular, BCAS1, esclerosis múltiple.

## **Abstract**

Oligodendrocytes are glial cells present in the central nervous system whose main function is axonal myelination. In addition, in the adult brain there is a relatively abundant cell population corresponding to oligodendrocyte precursor cells (OPC), which is maintained in an undifferentiated state. It has been recently described that a novel molecular marker of unknown function in the brain, namely BCAS1, is expressed by an oligodendroglial subpopulation circumscribed to intermediate stages of maturation. The interest of this marker lies mainly in the fact that it is expressed by premyelinating OPCs, being relevant in the study of processes such as myelin remodeling and remyelination in pathological processes. Our work aims to perform a descriptive characterization of the cell population defined by the expression of the BCAS1 marker in the human brain during childhood and adult stages, both in healthy tissue and that from multiple sclerosis patients. We hypothesized that BCAS1 could define an oligodendroglial subpopulation present from postnatal stages to the adult brain, acting as a reservoir of OPCs capable of responding to myelin remodeling needs. To address this hypothesis, we conducted immunofluorescence studies, electron microscopy and quantification of the cell density of BCAS1-positive cells in brain tissue samples from pediatric and adult donors. Our results suggest that BCAS1 protein is expressed in intermediate maturation stages of the oligodendroglial lineage in the human brain, without evident ultrastructural, molecular, or cell density differences between the compared child and adult groups.

**Key words:** oligodendrocytes, oligodendrocyte precursor cells, ventricular-subventricular zone, BCAS1, multiple sclerosis.



## Extended summary

### Background

Oligodendrocytes are glial cells present in the central nervous system (CNS) whose role is to produce myelin to wrap neuronal axons, provide trophic support to neurons and regulate the entry and exit of ions in axons and thus, are essential for a correct brain and spinal cord function. These cells arise from the ganglionic eminences during brain development and are highly capable to migrate to every brain area. However, not all the oligodendrocytes generated pre- and perinatally are destined for immediate myelination. Some of these cells, which comprise 2-9% of the total brain cellular composition, are kept as undifferentiated oligodendrocytes or oligodendrocyte precursor cells (OPCs) in the adult brain. Furthermore, the adult brain presents a remarkable region, known as the ventricular-subventricular zone (V-SVZ), which harbors neural stem cells that proliferate and differentiate into new immature neurons, but also into glial precursors such as OPCs in both normal and diseased brain. Indeed, several studies indicate that this area can respond to demyelinating insults during adulthood by generating OPCs *de novo*, suggesting that oligodendroglial progenitors could be a potential target for therapeutic strategies designed to promote myelin repair in the CNS.

Most authors divide oligodendrocyte lineage maturational stages into four consecutive steps: 1) early OPCs; 2) preoligodendrocytes (or late OPCs); 3) immature (or pre-myelinating) oligodendrocytes; and 4) mature (or myelinating) oligodendrocytes. Early OPCs are proliferative cells with great migratory capacity and specific expression of PDGFR- $\alpha$ , A2B5 and NG2. Although the morphology of early OPCs is slightly different depending on their location in the brain, these cells are normally characterized by a small polygonal soma and a multipolar tree of thin cellular processes. As a result of their intrinsic maturation process, OPCs give rise to preoligodendrocytes, which start expressing O4 and GPR17 and extend additional multipolar short processes. Upon loss of A2B5 and NG2 expression, immature oligodendrocytes become post-mitotic cells with long ramified branches and are committed to the oligodendroglial lineage. At this stage, immature oligodendrocytes continue to express O4 and begin to express galactocerebroside C (GalC). In the final stage of their maturation, oligodendrocytes extend membranes that form enwrapping sheaths around the axons and begin to express myelin proteins (i.e. MBP, PLP, MAG and MOG).

Recent studies have described a new myelin-associated protein, namely BCAS1, as a marker for a very specific population of oligodendrocyte progenitors circumscribed from late OPCs to pre-myelinating oligodendrocytes. BCAS1-expressing cells are described as actively myelinating

pre-oligodendrocytes within demyelinating lesions. Current evidence indicates that these cells originate from NG2-glia (or early OPCs) in the white matter of the mouse and human brain. Nevertheless, the role of BCAS1 and the presence of BCAS1-positive cells in non-myelinated areas of the brain is still elusive. This work aims to characterize the BCAS1<sup>+</sup> cell population in the human brain and to explore potential differences between adult and pediatric ages, both in healthy tissue and that from multiple sclerosis patients.

## **Material and methods**

We studied human brain tissue from donors of different ages which were distributed into two age-groups: the first group included samples from infants between 2 and 13 years old; the second group comprised adult population between 23 and 56 years old. We also analyzed a sample from a 59-year-old multiple sclerosis patient independently.

First, we assessed the molecular profile of the oligodendroglial lineage in our samples by immunofluorescence detection, including markers for different oligodendrocyte maturation stages (NG2, PDGFR- $\alpha$ , BCAS1, MAP and MBP). After confirming the presence of BCAS1<sup>+</sup> cells in both age groups, we described the fine structure of the human oligodendroglial lineage by combining immunogold detection for NG2, BCAS1 and Olig2 with transmission electron microscopy. Finally, we quantitatively analyzed the density of BCAS1<sup>+</sup> cells in the two age-groups after immunohistochemical detection with diaminobenzidine.

## **Results**

We performed immunofluorescence detection for different OPC maturational stages to characterize the identity of developing oligodendrocytes in the human brain. Consistent with previous studies, we confirmed the presence of early OPCs expressing the markers NG2 and PDGFR- $\alpha$ , intermediate oligodendrocyte precursors expressing BCAS1 and mature, myelinating oligodendrocytes expressing myelin-associated proteins such as MAP and MBP. Interestingly, our immunofluorescence analysis suggested that oligodendroglial developmental dynamics are similar in adults and infants. We next performed a descriptive ultrastructural analysis based on the detection of NG2, an early OPC marker, BCAS1 an intermediate maturational stage marker for OPCs and Olig2, a transcription factor which is expressed by all oligodendroglial cells, including mature oligodendrocytes. We observed that the morphology and fine structure of OPCs changes considerably during the maturational timeline of these cells but, intriguingly, no substantial differences were found between cells in the same maturational stage between infant and adult individuals. In addition, we found that BCAS1 expression is mostly localized at the cell membrane. Finally, we further investigated the dynamics of BCAS1<sup>+</sup> cells during postnatal brain development by immunohistochemical detection and quantification of BCAS1<sup>+</sup> cell density in the

brain of adult and infant donors. We did not find significant differences in the density of BCAS1<sup>+</sup> cells between the infant and adult groups (Mann-Whitney test,  $p > 0.05$ ).

### **Discussion and conclusions**

The identification of a transient BCAS1<sup>+</sup> oligodendroglial population associated with the active phase of myelination in the murine and human white matter represented a breakthrough for mapping and visualizing myelinating oligodendrocytes and indirectly correlating remyelinating *foci*, an interesting detail in demyelinating diseases. Our work aimed to carry out a descriptive characterization of the cell population defined by the expression of the BCAS1 marker in the human brain. We hypothesized that BCAS1 could define an oligodendroglial subpopulation present from postnatal stages to the adult brain, acting as a reservoir of OPCs capable of responding to myelin remodeling needs. Alternatively, we also considered the possibility of a different maturational timeline in pediatric and adult samples. Our results suggest that BCAS1 protein is expressed in the human brain in intermediate maturation stages of the oligodendroglial lineage without ultrastructural, molecular, or cell density differences between the compared infant and adult age groups.

We acknowledge some limitations in our study. These drawbacks were mainly related to limited sample size due to the difficult accessibility to human brain tissue, especially to samples from multiple sclerosis patients, hampering our statistical analyses.

To our knowledge, previous studies on BCAS1 in the human brain did not analyze pediatric population. We conclude that BCAS1 could be used as an active myelination marker in the human brain both in infant and adult ages, representing a potential therapeutic target for multiple sclerosis and other demyelinating pathologies.

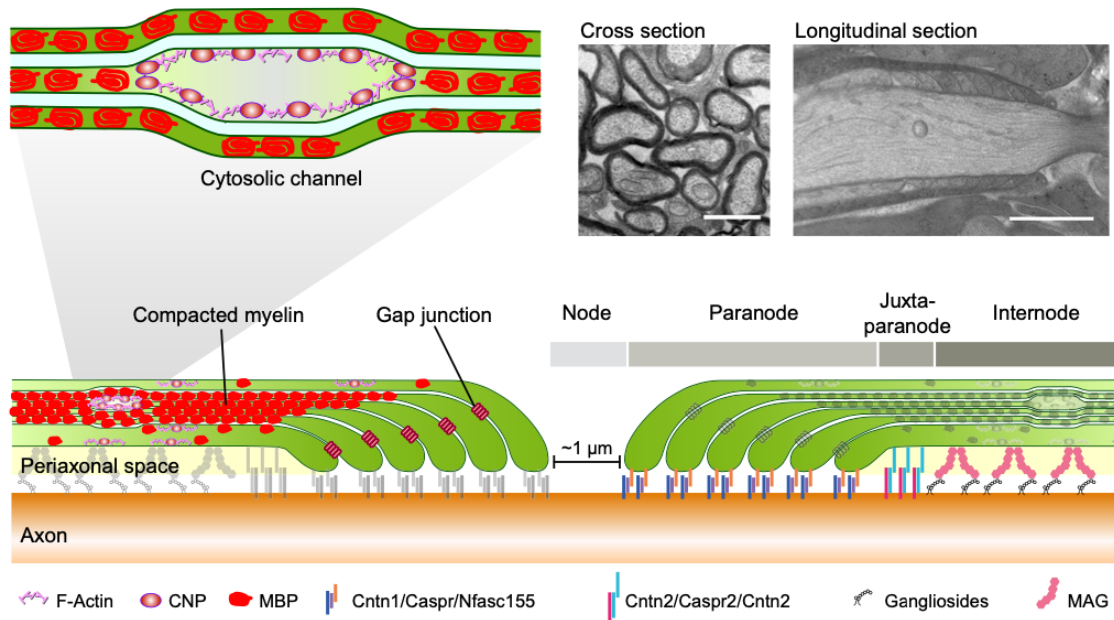
# 1. Introducción

## 1.1 Oligodendrocitos y mielinización

Los oligodendrocitos (OL) son las células encargadas del proceso de mielinización axonal en el sistema nervioso central (SNC). El término OL fue introducido por el neurólogo español Pío del Río Hortega y etimológicamente significa “glía ramificada”. Los OL forman parte del conjunto de la glía, células más pequeñas que las neuronas que ocupan aproximadamente la mitad del volumen del encéfalo y de la médula espinal, si bien la proporción entre el número de neuronas y células gliales varía entre diferentes regiones cerebrales. Podemos dividir las células gliales en dos grandes grupos: microglía y macroglía, incluyendo esta última categoría a las células endimarias, astrogía y oligodendrocitos en el SNC (1,2). Los OL son células relativamente pequeñas que presentan ramificaciones cortas y finas. Se encuentran localizadas tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris del SNC, situándose en hileras paralelas a los fascículos axonales (OL interfasciculares), asociadas a los somas neuronales (OL satélite) o bien asociadas a los vasos sanguíneos (OL perivasculares). Los OL interfasciculares son las células responsables de la síntesis de la vaina de mielina en el SNC (3). La mielina es un sistema de bicapas fosfolípídicas formadas por esfingofosfolípidos, cuya función es el aislamiento eléctrico de los axones para acelerar la velocidad de propagación del potencial de acción. Aunque su composición mayoritaria son lípidos, las extensiones de membrana de los OL contienen proteínas (PLP, MBP, MAG) que proporcionan integridad, estructura y funcionalidad a la vaina de mielina (4). PLP y MBP son las más abundantes de estas proteínas, constituyendo un 80% del total del contenido proteico, y están implicadas en el proceso de compactación que genera la estructura multicapa de la mielina madura (Fig. 1) (5,6).

Para asegurar una rápida y eficiente conducción del impulso nervioso, los axones mielinizados establecen y mantienen porciones no mielinizadas denominadas nódulos de Ranvier. En estos se concentran canales de sodio que median la despolarización de la membrana dando lugar a la conducción saltatoria. La mielina y los nódulos de Ranvier constituyen una de las uniones célula-célula más complejas conocidas, requiriendo un reconocimiento preciso, síntesis de grandes cantidades de membrana celular especializada y una motilidad celular intrincada para envolver hasta 100 capas de membrana alrededor de los axones (Fig. 1) (7). A diferencia de las células de Schwann del sistema nervioso periférico, un solo OL puede mielinizar varios axones, pero no todos son mielinizados de manera simultánea, ya que la producción de mielina es un proceso altamente regulado (6). En la sustancia blanca de adultos sanos la mielina se intercambia a un ritmo elevado a pesar de que la población de OL se mantiene relativamente estable con un

recambio anual de 1/300 células. Es decir, la remodelación miélica es un proceso dinámico e independiente del recambio celular (8,9). Diversas señales provenientes de neuronas eléctricamente activas, tales como factores de crecimiento, factores neurotróficos y la propia actividad eléctrica celular, regulan la expresión génica y los procesos implicados en la mielinización (10,11).



**Figura 1. Diagrama e imágenes de microscopía electrónica de transmisión mostrando la estructura de la mielina en el sistema nervioso central.** MBP es esencial para la generación de mielina compacta, uniendo las distintas capas de membrana plasmática entre sí. CNP interacciona con el citoesqueleto de actina y contrarresta, a nivel intracelular, las fuerzas adhesivas de MBP. Las distintas capas de membrana plasmática están, además, conectadas mediante uniones de tipo gap que permiten el paso bidireccional de iones y pequeñas moléculas. Extraído de Stadelmann *et al.*, 2019 (4).

Las alteraciones en el proceso de mielinización dan lugar a una conducción eléctrica anormal, dificultando la transferencia de información entre las diferentes regiones del cerebro. La comunicación entre axones y OL es de vital importancia en el origen de aquellas enfermedades neurológicas en las que la pérdida de OL y la desmielinización están asociadas a la degeneración axonal. Por ejemplo, en la esclerosis múltiple (EM), la pérdida de OL y la desmielinización están asociadas a una degeneración progresiva de los axones y al consiguiente declive neurológico (12,13).

## 1.2 Diferenciación del linaje oligodendroglial

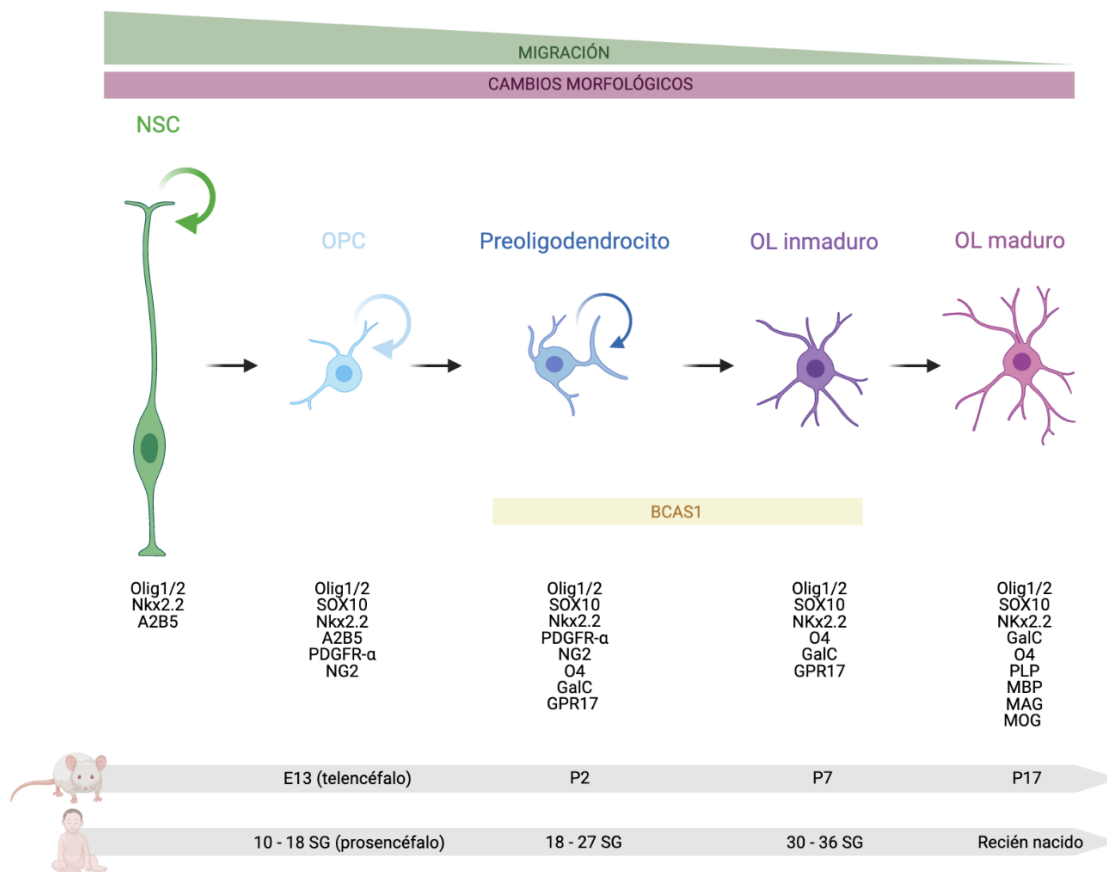
### 1.2.1 Etapas madurativas

Aunque existen diferencias notables entre el desarrollo del cerebro murino y humano, el ratón ha sido tradicionalmente utilizado como organismo modelo para el estudio del origen y diferenciación de los OL, tanto en etapas perinatales como en la edad adulta (14). Durante el desarrollo del cerebro, los OL son las últimas células generadas después de las neuronas y los astrocitos. Los OL se originan a partir de distintas corrientes migratorias de células progenitoras de oligodendrocitos (OPC, por sus siglas en inglés) que se suceden en forma de oleadas (15). Estas OPC, con capacidad de autorrenovación limitada, persisten durante toda la vida y suponen hasta el 9% de las células totales en la sustancia blanca y el 3% de las células totales en la sustancia gris del cerebro adulto (16,17), diferenciándose a OL maduros a lo largo del desarrollo cerebral, pero también en la etapa postnatal y adulta (18).

Durante su proceso madurativo, los precursores oligodendrogiales migran manteniendo su capacidad proliferativa. Una vez en su localización final, salen del ciclo celular y comienzan a diferenciarse hasta adquirir un fenotipo maduro mielinizante (19). La diferenciación de las OPC es un proceso complejo durante el cual las células atraviesan una serie de etapas madurativas finamente reguladas caracterizadas por cambios en su morfología, salida del ciclo celular y por cambios en la expresión de genes y proteínas requeridos para la maduración y mielinización (14).

La mayoría de los autores dividen los estados de maduración de los OL en cuatro etapas sucesivas, similares en el cerebro adulto y durante el desarrollo (Fig. 2):

1. Células precursoras de oligodendrocitos (OPC tempranas).
2. Preoligodendrocitos (OPC tardías).
3. Oligodendrocitos inmaduros (premielinizantes).
4. Oligodendrocitos maduros (mielinizantes).



**Figura 2. Etapas madurativas del linaje oligodendroglial.** La parte superior de la figura muestra las etapas madurativas del linaje oligodendroglial desde que células madre neurales (NSC, verde) dan lugar a células progenitoras de oligodendrocitos (OPC, azul claro). Estas, a su vez, comienzan un proceso de diferenciación y maduración que dará lugar sucesivamente a preoligodendrocitos (azul oscuro), oligodendrocitos inmaduros (OL inmaduro, morado) y finalmente oligodendrocitos maduros (OL maduro, rosa). Dichas etapas van acompañadas por cambios morfológicos y en la capacidad de migración y autorrenovación (indicada por flechas semicirculares en el diagrama). En la parte inferior de la figura se indica el patrón de expresión de marcadores moleculares característico de cada etapa madurativa, así como el pico de máxima producción celular durante el desarrollo murino (en días embrionarios o postnatales) y humano (en semanas de gestación). Se destaca el marcador BCAS1 por su especial interés en este estudio.

Inicialmente, las OPC presentan una morfología bipolar con procesos cortos y se caracterizan por su gran capacidad proliferativa y migratoria. Expresan PDGFR- $\alpha$ , el proteoglicano NG2 (antígeno glial 2), y el gangliósido A2B5 (20). Otros marcadores moleculares característicos de estas células son los factores de transcripción Olig1 y Olig2 presentes a lo largo de todo el proceso de desarrollo y maduración oligodendroglial. Aunque ambos están implicados en funciones estructurales, Olig2 juega un papel fundamental en etapas más tempranas del desarrollo, mientras

que Olig1 adquiere mayor protagonismo en la diferenciación terminal. Con su diferenciación progresiva, las OPC se convierten en preoligodendrocitos, también denominadas OPC tardías en la literatura. Se trata de células de mayor complejidad morfológica, con mayor cantidad de procesos ramificados que el estadio anterior y que se distribuyen de forma abundante en la corteza cerebral murina entre los días posnatales 4 y 10 (P4 y P10). Estas células, además de los marcadores anteriores, expresan la sulfatida (un galactolípido sulfatado) reconocida por el anticuerpo O4 (20) y la proteína GPR17 (21), persistiendo la expresión de ambas moléculas en los OL inmaduros. El avance en el proceso de diferenciación y maduración celular da paso a la expresión de galactosilceramida (GalC) y la pérdida de expresión de NG2 y A2B5, eventos que permiten identificar a los OL inmaduros. En esta fase, los OL están plenamente comprometidos hacia el linaje oligodendroglial y se convierten en células postmitóticas con ramificaciones largas. Estos continúan progresando hasta convertirse en OL maduros, los cuales se caracterizan por la síntesis de proteína básica de mielina (MBP), la glicoproteína asociada a mielina (MAG) y la isoforma madura de PLP1 (PLP) (14). No obstante, para la formación de la mielina los OL requieren establecer contacto con axones neuronales e iniciar la expresión de la glicoproteína del oligodendrocito asociado de mielina (MOG) (22).

### *1.2.2 Regulación del proceso de determinación y maduración oligodendroglial*

La generación del linaje oligodendroglial es un proceso finamente regulado que incluye la proliferación, migración y diferenciación celular y, en última instancia, la mielinización axonal. Dichos eventos requieren de una elevada tasa metabólica y de una interacción tanto con otros tipos celulares como con los vasos sanguíneos del parénquima cerebral (23). Estas características convierten a los OL en células altamente vulnerables a la alteración de los mecanismos de regulación que rigen su comportamiento, pudiendo comprometer el proceso de mielinización y provocar, eventualmente, problemas neurológicos (24–26).

Tanto en el desarrollo temprano como en etapas adultas, concurre una combinación de diferentes vías de señalización que, junto con modificaciones epigenéticas, modulan la proliferación, migración y diferenciación de las OPC a partir de células madre neurales. Al mismo tiempo, algunas de las moléculas implicadas en la regulación de dichos procesos sirven como marcadores de identidad celular específicos de cada una de las etapas del proceso madurativo (Fig. 2) (27). Diversos trabajos sugieren que sólo el factor de transcripción Olig2 es absolutamente necesario para la especificación del linaje oligodendroglial, siendo otros factores importantes pero no fundamentales en dicho proceso (28). En general, se puede hacer una distinción entre reguladores positivos y negativos en el proceso de diferenciación oligodendroglial. Entre los primeros destacan los factores transcripcionales Nkx2.1, GSH2 y EMH, pertenecientes a la



familia *helix-loop-helix* (HLH), que potencian y estimulan la diferenciación, así como la expresión de genes que codifican proteínas asociadas a la mielina como MBP (29), PLP (30) y MAG (31,32). Entre los reguladores negativos encontramos moléculas de la familia Wnt, que inhiben la expresión de proteínas asociadas a la mielina y mantienen las OPC en un estado indiferenciado y quiescente (33–35).

La fisiología del linaje oligodendroglial ha sido ampliamente estudiada tanto *in vivo* como *in vitro*, observándose que son células que responden a una serie de moléculas tales como citoquinas (36), factores de crecimiento (37–39), neurotransmisores como GABA y glutamato (40), hormonas como la triyodotironina (T3) (41) e IGF-1 (42,43) y otras moléculas como el ácido retinoico (44). La mayoría de estas señales actúan por medio de rutas de señalización intracelular de las familias Wnt, hedgehog, BMP (27,45) y Notch (46). No obstante, resulta complicado determinar el grado de contribución de cada uno de estos factores de forma aislada, ya que ha sido descrito que la combinación de varios de ellos produce efectos significativamente diferentes (20,24). Asimismo, cada uno de estos grupos de señales ha sido relacionado con efectos en diferentes aspectos funcionales de las células del linaje oligodendroglial como la supervivencia, proliferación, migración, maduración y recuperación funcional (Tabla1) (27).

Recientemente se han descrito mecanismos epigenéticos que también contribuyen a la regulación de los procesos de determinación, maduración y mielinización en el linaje oligodendroglial (47). Así pues, se han identificado miRNA que participan en la regulación de la diferenciación oligodendroglial y en el mantenimiento de la mielinización tanto en el cerebro sano como en patologías desmielinizantes (48,49). A su vez, los procesos de metilación de los promotores de diversos genes han sido asociados a la modulación de la diferenciación de los OL, así como al proceso de mielinización tanto en el cerebro en desarrollo como adulto (50). Por último, se han descrito también modificaciones de histonas mediadas por deacetilasas (Hdac) que intervienen en la diferenciación hacia OL a partir de células madre neurales (27).

**Tabla 1.** Moléculas implicadas en la regulación del linaje oligodendroglial. Modificado de Waly et al., 2014 (27).

| Molécula                                       | Supervivencia | Proliferación | Migración | Maduración | Mielinización |
|--|---------------|---------------|-----------|------------|---------------|
| <b>Factores de crecimiento</b>                 |               |               |           |            |               |
| FGF2   |               | ↑             | ↑         | ↑          | ↑ / ↓         |
| EGF  | ↑             | ↑             | ↑         |            | ↑             |
| Nrg-1  | ↑             |               |           | ↑          | ↑             |
| <b>Factores neurotróficos</b>                  |               |               |           |            |               |
| BDNF+NT3                                       |               | ↑             |           | ↑          | ↑             |
| PDGF   |               | ↑             | ↑         |            |               |
| <b>Señales quimiotácticas</b>                  |               |               |           |            |               |
| Semaforinas                                    |               |               | ↑ / ↓     |            |               |
| Reelina  |               |               | ↑         |            |               |
| Netrin1  |               |               | ↑         |            |               |
| <b>Citoquinas</b>                              |               |               |           |            |               |
| TNFα   |               | ↑             |           | ↑          | ↓             |
| LIF  | ↑             | ↑             |           | ↑          |               |
| CNTF   |               | ↑             | ↑         | ↑          |               |
| CXCL1  | ↑             | ↓             |           | ↓          | ↓             |
| CXCL12   |               |               | ↑         | ↑          |               |
| <b>Morfógenos</b>                              |               |               |           |            |               |
| Shh  | ↑             | ↑             |           | ↑          |               |
| BMP  |               |               | ↓         | ↓          | ↓             |
| Wnt  |               |               |           | ↓          |               |
| <b>Hormonas</b>                                |               |               |           |            |               |
| IGF1   | ↑             | ↑             |           |            |               |
| T3   | ↑             | ↑             |           |            | ↑             |
| RXR-g  |               |               |           | ↑          |               |
| <b>Comunicación célula-matriz extracelular</b> |               |               |           |            |               |
| Integrinas                                     |               |               |           | ↓          |               |
| CSPG   |               |               | ↓         |            |               |
| <b>Comunicación célula-célula</b>              |               |               |           |            |               |
| Notch-1  |               | ↑             |           | ↓          | ↑             |
| Lingo-1  |               |               |           | ↓          | ↓             |
| PSA-NCAM                                       |               |               | ↑         | ↓          |               |

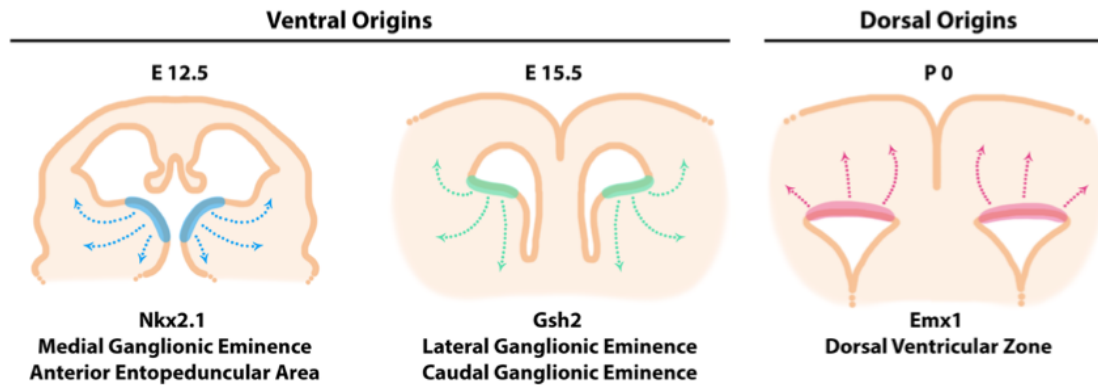
Al margen de los anteriores factores intrínsecos, existe también influencia del ambiente en el comportamiento de las células del linaje oligodendroglial. Por ejemplo, se ha observado que el aprendizaje de una nueva tarea de tipo visuomotor requiere mielinización activa por parte de las OPC presentes en el cerebro adulto y que, de eliminarse genéticamente dichas células sin alterar la mielina ya presente ni los OL maduros, el aprendizaje se ve afectado negativamente (51). Asimismo, se ha observado mediante tractografía con tensores de difusión (DTI) que el aprendizaje de tareas complejas durante la infancia, como tocar el piano, se correlaciona con una organización diferente de los tractos de fibras de la sustancia blanca (52). Por último, se ha observado también que, tras una lesión desmielinizante, el aprendizaje de tareas motoras y el ejercicio físico aeróbico promueven la remodelación de la mielina y la recuperación funcional en ratones (53,54).

### 1.3 Oligodendrogénesis durante el desarrollo

Los OL están presentes tanto en la sustancia blanca y gris del cerebro como de la médula espinal y, aunque todos derivan de OPC, su origen y maduración a OL mielinizantes difiere y es mucho más compleja a nivel cerebral que a nivel espinal. La generación de nuevas OPC durante el desarrollo se produce en la zona ventricular del prosencéfalo en formación a partir de tres oleadas de progenitores neurales que generan poblaciones de OPC que, bajo la expresión de factores de transcripción específicos, marcarán estas tres secuencias espacial y temporalmente diferenciadas que progresan desde la región ventral a la dorsal (55).

En el cerebro de ratón, las dos primeras oleadas se originan a partir de la región ventral ventricular bajo la influencia de Shh y Olig2. Hasta la fecha, Shh es considerada la principal señal ventralizante para el desarrollo de OL en el tubo neural (56–60). Las OPC de la primera oleada se generan a partir de células precursoras positivas para el marcador Nkx2.1 (Nkx2.1<sup>+</sup>) de la eminencia ganglionar medial (MGE) y del área entopeduncular anterior (AEP), que aparecen en el día embrionario 12.5 (E12.5) (58). A medida que el desarrollo continúa, estas células disminuyen hasta que desaparecen completamente en P10 (61). La segunda oleada, se origina a partir de la eminencia ganglionar lateral (LGE) y caudal (CGE) a partir de progenitores Gsh2<sup>+</sup> en el día E15. Posteriormente, en P0, surge la tercera oleada a partir de progenitores Emx1<sup>+</sup> de la región dorsal ventricular que eventualmente mielinizarán el neocórtex (Fig. 3). De este modo, tres oleadas de subpoblaciones de OPC compiten por el espacio y son necesarias para colonizar el SNC durante el desarrollo (15). En el día postnatal 2 (P2) el estadio madurativo predominante son los preoligodendrocitos, mientras que en P7 la sustancia blanca contiene más del 80% de células oligodendrogiales en estadio de oligodendrocitos inmaduros (62). Después de su formación, las OPC migran y colonizan todo el SNC. Las OPC generadas ventralmente predominan en la médula espinal, mientras que las generadas dorsalmente prevalecen en las vesículas telencefálicas (Richardson, 2006).

Esta sucesión de eventos concatenados a lo largo del desarrollo embrionario para dar lugar a la población de OL presente en el cerebro adulto llevó a la idea de que las distintas poblaciones de OPC podrían ejercer diferentes funciones. Sin embargo, hasta la fecha ningún estudio ha correlacionado un origen distinto con una especificidad en el comportamiento de OPC en el SNC postnatal y adulto.



**Figura 3. Los OL se generan a partir de tres oleadas espacial y temporalmente diferenciadas.** Los OL poseen distintas propiedades según su origen ontogenético. Las tres oleadas que surgen de la zona ventricular del prosencéfalo en desarrollo siguen una progresión ventral-lateral-dorsal. La primera oleada depende de Shh, mientras que las últimas olas son independientes de dicha molécula (57,63). La primera oleada (E12.5) es generada a partir de progenitores que expresan Nkx2.1 de la eminencia ganglionar medial y del área entopeduncular anterior. La segunda oleada (a partir de E15.5) es generada por progenitores Gsh2<sup>+</sup> de las eminencias ganglionares lateral y medial. La tercera oleada (posnatal) es generada por progenitores Emx1<sup>+</sup> que surgen de la zona ventricular dorsal, subyacente a la corteza en desarrollo. Extraído de Newville *et al.* 2017 (64).

Existen pocos estudios que hayan evaluado la secuencia temporal del desarrollo de los OL en humanos. Mientras que en el cerebro humano la proliferación y migración de neuronas ocurren principalmente durante el periodo prenatal, la proliferación y migración de las células gliales son esencialmente postnatales, completándose con los procesos de diferenciación y maduración durante la infancia (14). Las primeras OPC se observan en el prosencéfalo fetal a las 10 semanas de gestación (10 SG), apreciándose un aumento en su número alrededor de las 15 SG en las zonas correspondientes a las futuras eminencias ganglionares y en la zona periventricular (65). Entre las 18 y las 28 SG los preoligodendrocitos son el estadio madurativo más abundante. Alrededor de las 30 SG se observa un aumento de la complejidad morfológica (células multipolares) conforme algunas de estas células avanzan en su proceso madurativo. Los primeros OL maduros MBP<sup>+</sup> se observan a partir de las 20-28 SG en las regiones subcorticales; no obstante, a partir de las 36 SG y, especialmente, tras el final de la gestación es cuando se convierten en el estadio celular más abundante, correlacionándose con un aumento de la sustancia blanca mielinizada de hasta el 5% del volumen total del cerebro en esta etapa (66,67).

La maduración de los OL y la aparición de mielina son procesos que progresan a lo largo de una secuencia cronológica y topográfica característica, comenzando en áreas relacionadas con la

homeostasis básica y avanzando hacia regiones que controlan funciones más complejas. Dada la superposición de estas fases, existen dudas sobre la extensión cronológica de las distintas etapas en las distintas regiones cerebrales (14). Una vez completado el desarrollo del SNC, existe una subpoblación de OPC que persiste en un estadio inmaduro y que se encuentra distribuida por todo el cerebro. Dicha población de OPC tiene una capacidad de proliferación lenta o inactiva y actúa como reservorio, pudiendo diferenciarse a OL mielinizantes durante la vida postnatal (68–70).

### 1.5 Oligodendrogénesis en el cerebro adulto

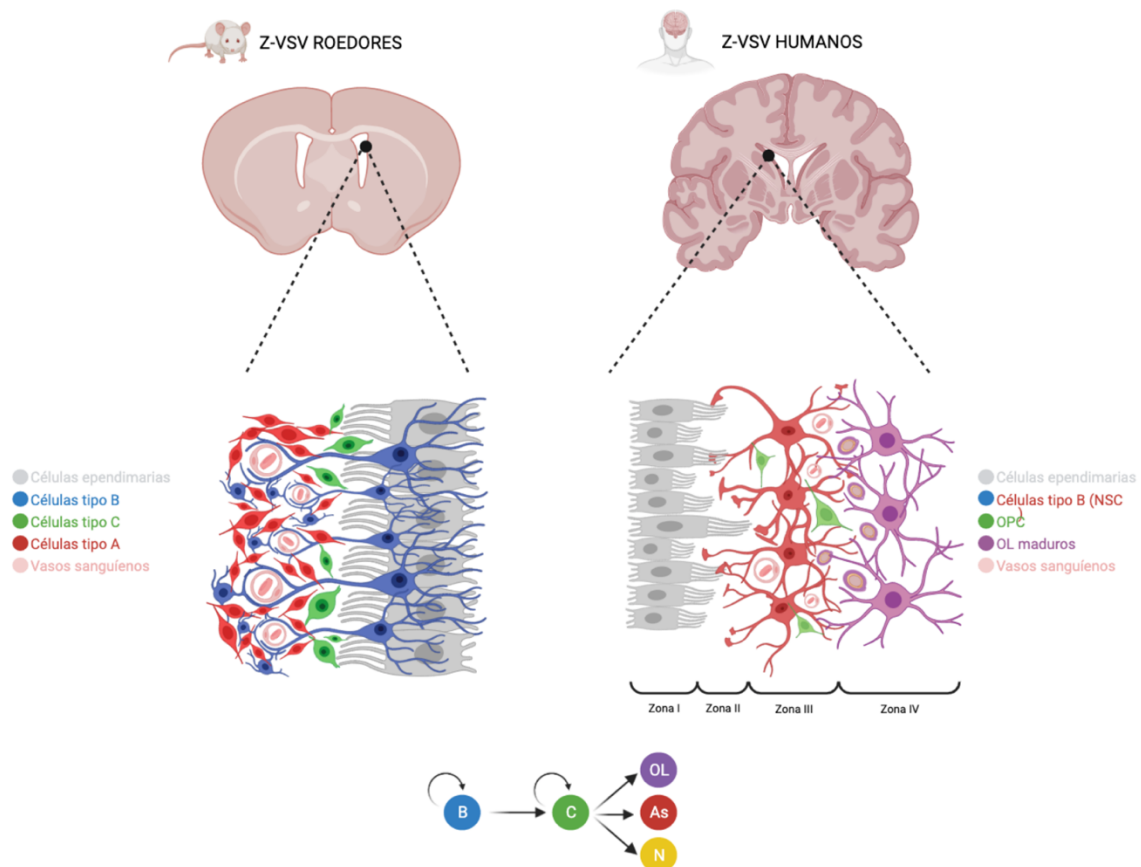
Pese a que la oligodendrogénesis es un proceso que se inicia de forma tardía en el desarrollo del SNC y que la mayoría de OPC se forman en etapas perinatales, el cerebro adulto mantiene cierta capacidad de producir nuevos OL, aunque a menor ritmo que el cerebro en formación. Las células progenitoras de OL incluyen principalmente OPC que representan alrededor del 5% del número total de células en el parénquima cerebral adulto (17,71). La densidad de OPC parenquimales parece no variar en la etapa adulta, pero sus características difieren entre la sustancia blanca y la sustancia gris. Por ejemplo, la capacidad proliferativa y de diferenciación es mayor en la sustancia blanca respecto a la sustancia gris. En cuanto a su diferenciación, las OPC presentes en la sustancia gris permanecen quiescentes en estado inmaduro, pero manteniendo cierta capacidad de reactivación, mientras que las presentes en la sustancia blanca están más activas y contribuyen a la remodelación de la mielina adulta (68).

Además de las OPC distribuidas por todo el parénquima cerebral, en la mayoría de mamíferos existen dos regiones cerebrales donde residen células multipotentes conocidas como células madre neurales (NSC), con potencial para generar nuevas neuronas, astrocitos y oligodendrocitos: la zona ventricular-subventricular (ZV-SV) y la zona subgranular (ZSG) del giro dentado del hipocampo (72–75). Aunque no existen evidencias publicadas que apoyen una oligodendrogénesis significativa en la ZSG del hipocampo, en la ZV-SV sí que se ha descrito una producción de OPC abundante y sostenida a lo largo de toda la vida a partir de NSC (69–71).

La ZV-SV es una región germinal localizada en la pared lateral de los ventrículos laterales cerebrales con una organización celular característica y que difiere ligeramente entre el cerebro humano adulto y el de animales de experimentación (59,76). En ratones (Fig. 4, izquierda), la ZV-SV incluye una primera capa de células endimarias (o células tipo E). Son células postmitóticas (77), cúbicas y multiciliadas (78) encargadas del barrido del líquido cefalorraquídeo (LCR) y del aislamiento la cavidad ventricular del parénquima cerebral subyacente (79). Por debajo de esta primera capa endimaria, se encuentran células tipo B con características astrogliales y consideradas las NSC *bona fide* de esta región. Poseen capacidad de autorrenovación potencialmente ilimitada y pueden dividirse simétricamente dando lugar a dos nuevas células tipo

B o asimétricamente, dando lugar a una célula tipo B y a una célula tipo C (80). A su vez, estas células B se clasifican entre aquellas que contactan con la luz ventricular mediante un proceso apical terminado en un cilio primario (células B1) y aquellas que no lo hacen (células B2). Las células tipo C, también llamadas células de amplificación transitoria, son células originadas a partir de células tipo B. Tienen alta capacidad mitótica y dan lugar a precursores específicos de nuevas neuronas (células tipo A), astrocitos u OL (75,78).

En humanos la organización de la ZV-SV difiere ligeramente de la observada en el cerebro de ratón (Fig. 4, derecha). Dispone de una primera monocapa de células endimarias o zona I en contacto con la luz del ventrículo, similar a la del ratón, que se continua con la capa hipocelular o zona II, formada por procesos astrocíticos y endimarios, muy pobre en cuerpos celulares y ausente en roedores. La zona III o ribete astrocítico presenta mayoritariamente cuerpos celulares de naturaleza astrocítica, similares a las células tipo B del ratón, con cierta capacidad proliferativa en los primeros meses de vida, reduciéndose esta en el primer año de vida (76,81). Finalmente, se encuentra una zona de transición con el resto de la sustancia gris, formada por principalmente por cuerpos celulares de OL y axones mielinizados y que se denomina zona IV (59,82).



**Figura 4. Diferencias en la organización de la ZV-SV del cerebro de ratón y humano adultos.** La parte izquierda de la imagen corresponde a un corte coronal de cerebro murino donde se

muestra la citoarquitectura de la ZV-SV. Se observan células tipo B (tanto B1, en contacto con la cavidad ventricular, como B2) según su disposición con respecto a los tipos celulares del nicho neurogénico. La parte derecha de la imagen representa un corte coronal de cerebro humano adulto mostrando la ZV-SV. La capa I está compuesta por células endimarias multiciliadas en su polo apical y procesos celulares en su polo basal. La capa II o gap hipocelular está formada por procesos celulares de las capas I y II. La capa III alberga los cuerpos de células tipo B, principalmente, y la capa IV con OL maduros y axones a los que mielinizan. La parte inferior de la figura ilustra la generación de precursores neurales específicos a partir de células madre neurales.

La producción de nuevas OPC en la ZV-SV no es espacialmente homogénea, sino que existen diferentes regiones con distinta actividad proliferativa y compromiso hacia la formación de unos tipos celulares u otros. Así, ha sido descrito en el cerebro de ratón que la parte dorsal de la ZV-SV (área más próxima al cuerpo caloso), bajo el estímulo de Wnt (45), es el área de mayor proliferación celular en contraposición a la parte ventrolateral (área más próxima al estriado), bajo el estímulo inhibitorio de BMP (83). Por otra parte, se ha evidenciado la existencia de un dominio dorsal de la ZV-SV influenciado por los niveles de Shh que da lugar a abundantes OL destinados al cuerpo caloso. Además, la proporción de OPC producidas correlaciona directamente con los niveles de dicha molécula, convirtiendo esta región en una fuente importante de OL en el prosencéfalo posnatal de mamíferos (84).

Una de las hipótesis más aceptadas en cuanto al significado biológico de esta perdurabilidad en la síntesis de OL a lo largo de la vida sugiere que el aporte de nuevos OL contribuye a la mielinización y/o remodelación de la mielina, proceso que puede ser importante para la plasticidad neuronal, el aprendizaje y la memoria, así como para la reparación ante lesiones desmielinizantes (27).

## **1.6 BCAS1 como marcador del linaje oligodendroglial**

BCAS1 se identificó originalmente como un ARNm amplificado en líneas celulares de cáncer de mama (85). Estudios recientes de transcriptómica han demostrado también su expresión a nivel cerebral, concretamente, en una subpoblación de OL en estadio madurativo intermedio (86), derivados de OPC (87). BCAS1 es una proteína básica de 31 kDa presente en el citosol de los OL y en las áreas no compactadas de la mielina (87). Está formada por dos dominios asociados al citoesqueleto que interactúan con la cadena de dineína y que se regula a la baja con la diferenciación celular (88). Por tanto, las células que expresan BCAS1 (BCAS1<sup>+</sup>) en el cerebro representan una subpoblación característica del linaje oligodendroglial correspondiente a OL en

estadio madurativo intermedio y que se han descrito como OL premielinizantes (87,89). En el cerebro humano, la población de OL BCAS1<sup>+</sup> está restringida a la sustancia blanca en la etapa fetal y postnatal temprana. La expresión de dicho marcador comienza a aparecer en la sustancia blanca entre las 17 y 27 SG, alcanza sus valores más altos en los recién nacidos e inicia su descenso entre los 2 y 8 años de edad, sobre todo a nivel del cuerpo calloso (87).

La densidad de OL BCAS1<sup>+</sup> se ha correlacionado con la secuencia cronológica de la mielinización en la sustancia blanca, de manera que, regiones cerebrales que controlan tareas más complejas, como la corteza frontal, y que generan mielina más tardíamente muestran una mayor densidad de células BCAS1<sup>+</sup> durante la adolescencia y la edad adulta joven. En términos generales, el mayor número de células con morfología mielinizante está presente en los primeros años de vida y disminuye progresivamente con la edad. Sin embargo, los OL BCAS1<sup>+</sup> de la sustancia gris cortical, sobre todo a nivel frontal, persisten de forma más dilatada en el tiempo y se mantienen hasta la vejez (87).

Estos hallazgos respaldan que el número de OL en la sustancia blanca humana se establece principalmente en los primeros años de vida, mientras que en la sustancia gris continúan generándose nuevos OL en la edad adulta (90). La identificación de una población oligodendroglial transitoria BCAS1<sup>+</sup>, asociada preferentemente con la fase activa de mielinización de la sustancia blanca tanto murina como humana, se ha convertido en un marcador útil para mapear y visualizar OL mielinizantes (85,87). Hasta el momento, no existía ningún marcador molecular que permitiera la discriminación de axones mielinizados de los remielinizados, siendo la mielinización en curso notoriamente difícil de detectar. El hecho de que un aumento de la expresión de BCAS1 se correlacione indirectamente con focos de remielinización resulta de especial interés en enfermedades neurodegenerativas que afectan al SNC y que cursan con pérdida de mielina. Dentro de este grupo, la EM es la patología más ampliamente estudiada (91).

### **1.7 Implicación de los OL en la fisiopatología de la esclerosis múltiple**

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica del SNC que conduce a la desmielinización y neurodegeneración, siendo la principal patología desmielinizante en el SNC. Es una de las causas más comunes de discapacidad neurológica en adultos jóvenes a nivel mundial (92). Se estima que aproximadamente 2,5 millones de personas en todo el mundo la padecen, la mayoría de ellas mujeres (proporción mujeres-hombres 2:1) de entre 20 y 40 años. Independientemente de la prevalencia, su incidencia está en aumento (93). Aunque su etiología es desconocida, se considera una patología multifactorial en la que la interacción compleja de factores genéticos y



ambientales determinan el riesgo de enfermedad de un individuo. La susceptibilidad genética está determinada principalmente por cambios en el sistema del antígeno leucocitario humano, habiéndose relacionado los haplotipos de los alelos HLA-DRB1 y HLA-DQB1 (94–96). Entre los factores ambientales estudiados se asocian la infección virus de Epstein Barr y virus herpes humano 6A (97), el tabaquismo (98,99), los niveles bajos de vitamina D (100–103) y un índice de masa corporal alto durante la adolescencia (104). Además, algunos de estos factores como los niveles de vitamina D y el tabaco también influyen el curso subsiguiente de la enfermedad (105). No obstante, los resultados inmunológicos y los estudios genéticos e histopatológicos de pacientes enfermos apoyan la idea de que la autoinmunidad juega un papel muy importante tanto en el origen como en el curso de la enfermedad (106).

Tradicionalmente, la EM se ha categorizado en cuatro fenotipos clínicos distintos: remitente-recurrente (EMRR), secundaria progresiva (EMSP), primaria progresiva (EMPP) y progresiva-recurrente (EMPR) (107). No obstante, esta categorización resulta meramente teórica, ya que no existen pruebas de laboratorio ni de imagen que permitan discernir los diferentes subtipos y en la práctica clínica, a menudo, puede existir superposición o transición entre estos fenotipos. La mayoría de los pacientes padecen la forma EMRR, mientras que entre el 10 y 20% presentan EMPP. Los casos de EMRR, sobre todo los no tratados, evolucionan a EMSP a los 10 – 20 años del diagnóstico (108,109); no obstante, se desconoce el impacto sobre estas cifras con las nuevas opciones terapéuticas. Esta gran variabilidad en el curso de la enfermedad dificulta el pronóstico y la optimización del tratamiento, pero la edad avanzada, el sexo masculino, la raza no caucásica, la presencia de bandas oligoclonales específicas en LCR, la visualización de lesiones cerebelosas y/o espinales, las recaídas frecuentes y el acúmulo de discapacidad tras los brotes predicen un curso más activo o agresivo (110,111). Los síntomas neurológicos y psiquiátricos están determinados por la ubicación de las áreas desmielinizadas que conllevan pérdida de sensibilidad, debilidad muscular o espasmos, ataxia, problemas visuales, fatiga, incontinencia y alteraciones del estado de ánimo (112).

A nivel anatomopatológico, en función de la presencia y distribución de los infiltrados inflamatorios, el daño tisular y la capacidad de remielinización espontánea se clasifican tres tipos de lesiones (113–115):

- Lesiones activas: áreas desmielinizadas de bordes difusos, hiper celulares, con infiltrado linfocítico perivascular, edema, pérdida de mielina y OL, daño axonal, macrófagos cargados de debris de mielina, astrocitos hipertróficos y, ocasionalmente, con cicatriz glial. Este tipo de lesiones son susceptibles de procesos de remielinización espontánea.

- Lesiones crónico-activas: áreas desmielinizadas bien delimitadas. Los bordes de la lesión con signos desmielinización activa se conocen como periplaca y es donde se localizan infiltrados inflamatorios perivasculares, macrófagos cargados de debris de mielina y lípidos, astrocitos hipertróficos, además de un mayor número de OL y signos de remielinización. En este tipo de lesiones no se ha observado ningún tipo de remielinización espontánea.
- Lesiones crónico-inactivas: suelen ser de mayor extensión y con bordes bien definidos. Presentan desmielinización completa, un reducido número de axones aún intactos, pocos macrófagos y vasos sanguíneos con endotelio fino. No se observan OL ni signos de desmielinización ni de remielinización activa.

El diagnóstico es de exclusión, basado en la demostración de criterios clínicos y/o radiológicos de lesiones en el SNC diseminadas en espacio y en tiempo que reúnen los criterios de McDonald de 2017 (Tabla 2).

**Tabla 2.** Criterios de McDonald revisados en 2017 para el diagnóstico de la EM.

#### **Diseminación en espacio**

Presencia de al menos una lesión en al menos dos de las siguientes áreas:

- Periventricular.
- Cortical o yuxtacortical.
- Infratentorial.
- Médula espinal.

#### **Diseminación en tiempo**

- Una nueva lesión que realza en T2 o captante de gadolinio en RMN de seguimiento con respecto la RMN inicial.
- Presencia simultánea de lesiones asintomáticas captantes y no captantes de gadolinio en cualquier momento.
- En pacientes que cumplen con criterios de diseminación en espacio, la presencia de bandas oligoclonales en LCR podría demostrar diseminación en tiempo permitiendo el diagnóstico de EM.

La incorporación de la resonancia magnética nuclear (RMN) en el diagnóstico de la EM ha permitido la detección de áreas desmielinizantes asintomáticas, por lo que se considera la herramienta más sensible y precoz para la detección de lesiones desmielinizantes en el SNC. La presencia de bandas oligoclonales de IgG en LCR ausentes en suero es una manifestación de la EM y, pese a que este hallazgo solo apoya la sospecha diagnóstica, es particularmente útil en individuos en cuya RMN cerebral basal no existen hallazgos sugestivos de EM (116). Pese a que las RMN seriadas permiten evaluar de forma indirecta la integridad de la mielina con la detección y seguimiento de las lesiones inflamatorias desmielinizantes (117), no existe ninguna técnica que permita discernir áreas mielinizadas de remielinizadas ni áreas de remielinización en curso. Hasta el momento, el estudio anatomohistopatológico ha sido la única forma de ratificar la formación

de nuevas vainas de mielina, tomando como referencia las denominadas placas de sombra (zonas de mielina con tinción más débil), no obstante, este análisis no proporciona información sobre el momento en que la remielinización se lleva a cabo (118,119).

El descubrimiento reciente de BCAS1 como marcador de OL en estadio de maduración intermedio ha permitido, en el ámbito de la investigación, la detección de áreas de formación de nuevos OL formadores de mielina. Generalmente, las lesiones crónicas completamente desmielinizadas y las lesiones completamente remielinizadas (cubiertas con mielina pálida correspondiente a placas de sombra) rara vez contienen OL BCAS1<sup>+</sup>; por el contrario, los bordes de las lesiones parcialmente remielinizadas suelen contener OL BCAS1<sup>+</sup>. La alta densidad de estos OL en el borde y el interior de las áreas remielinizantes, en contraposición a su baja densidad en el núcleo/zona central, sugiere que la remielinización comienza en el borde de la lesión de la sustancia blanca y se mantiene incluso en etapas tardías de la enfermedad. Por tanto, la presencia de OL BCAS1<sup>+</sup> en lesiones con actividad inflamatoria y/o desmielinizante en curso y en lesiones completamente inactivas sugiere que el reclutamiento de OPC y la estimulación de la remielinización son independientes de la actividad de la lesión (120).

Actualmente la EM se considera una patología autoinmune del complejo oligodendrocito-mielina que carece de tratamiento curativo. Actualmente, el principal objetivo terapéutico es detener o ralentizar la enfermedad, así como mejorar la calidad de vida de los pacientes, sin posibilidad de actuar en el recambio de las células dañadas. Las técnicas terapia regenerativa basadas en OPC endógenas podría ser una estrategia prometedora para estimular la formación de OL maduros con capacidad de regeneración funcional de la mielina. Por ello, en este trabajo, caracterizamos OL en estadios madurativos intermedios como células con potencial capacidad mielinizante tras alcanzar el completo desarrollo.

## 2. Hipótesis y objetivos

El objetivo principal de este trabajo es el estudio del proceso de maduración del linaje oligodendroglial mediante la caracterización de una población específica de células precursoras de oligodendrocitos con capacidad mielinizante. Dicha población está definida por la expresión del marcador molecular BCAS1. Nuestra hipótesis de trabajo establece que la población de OL BCAS1<sup>+</sup> es morfológica y funcionalmente reconocible en el linaje oligodendroglial, manteniéndose en el cerebro humano como un reservorio de OPC, tanto en edades pediátricas como adultas.

Para comprobar dicha hipótesis planteamos los siguientes objetivos generales:

1. Identificar y correlacionar distintos marcadores con las etapas de desarrollo del linaje oligodendroglial, así como los cambios morfológicos que sufren estas células durante su maduración.
2. Determinar, cualitativamente, potenciales diferencias en la población BCAS1<sup>+</sup> en muestras de pacientes de esclerosis múltiple.
3. Estudiar la dinámica temporal del número de células que expresan BCAS1 en muestras adultas y pediátricas de tejido cerebral humano.

Para alcanzar dichos objetivos, se estudiaron muestras de cerebro humano de un amplio rango de edades. Mediante estudios inmunohistoquímicos y ultraestructurales se caracterizaron distintas etapas evolutivas del linaje oligodendroglial basados en la expresión de diversos marcadores específicos, tanto en tejido de donantes control de diversas edades como en pacientes de esclerosis múltiple. Además, se realizó un análisis cuantitativo comparativo de las células BCAS1<sup>+</sup> para determinar la presencia de diferencias entre donantes en edad pediátrica y edad adulta.

### 3. Material y métodos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en la compañía Sigma-Aldrich salvo que se especifique lo contrario.

#### 3.1 Muestras biológicas

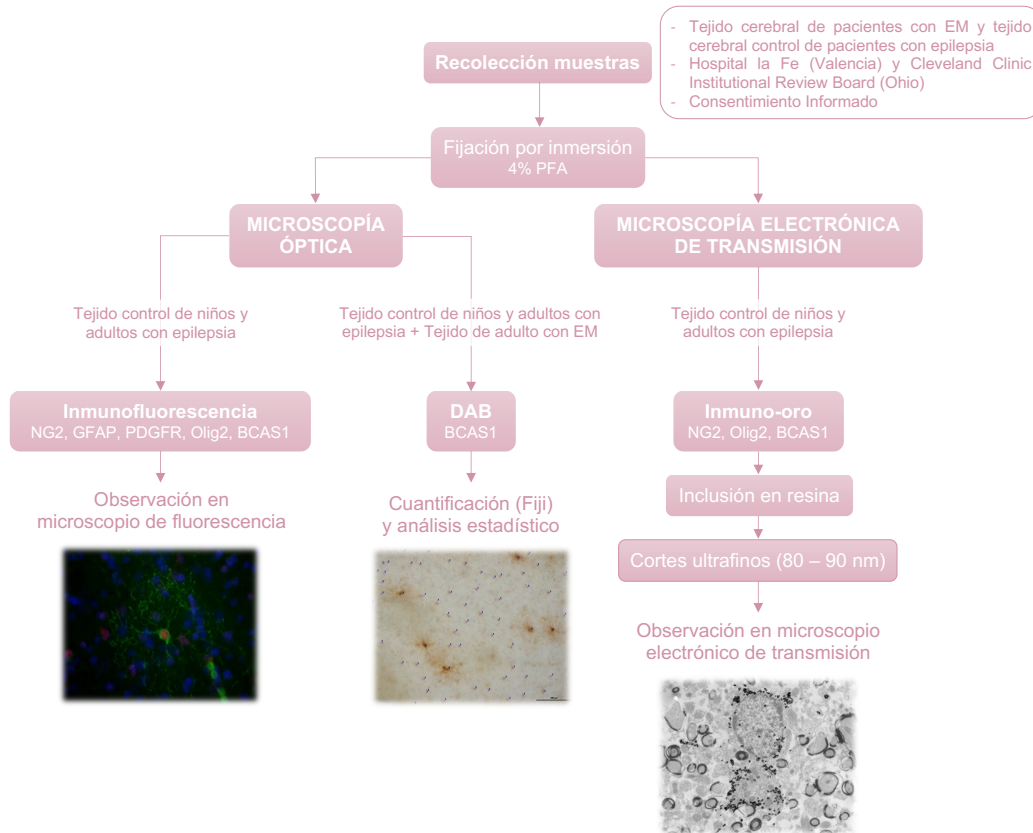
Para el estudio presentado, se utilizó material biológico de distintas fuentes. Por un lado, se emplearon resecciones de tejido cerebral de pacientes con epilepsia fármacorresistente procedentes del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (Valencia, España); por otro, se analizó una muestra de una paciente de EM donada al Biobanco de Cleveland Clinic (Ohio, EEUU). Las muestras contaban con el consentimiento informado de los pacientes o de sus familiares para formar parte de la investigación y todos los procedimientos que se llevaron a cabo fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación en Humanos de la Universitat de València (H1436176523231) y el comité Ético de Investigación Biomédica del Hospital Universitario y Politécnico la Fe (2015/0044) y se realizaron de acuerdo con los estándares éticos de la Declaración de Helsinki de 1964 y sus posteriores enmiendas.

Se utilizaron muestras procedentes de resecciones quirúrgicas de pacientes con epilepsia refractaria, 4 de ellos adultos y otros 4 niños, realizadas por la Unidad de Cirugía de Epilepsia del Hospital La Fe. Previamente a la cirugía se evaluó el volumen y características estructurales de la zona cerebral afectada mediante RMN. Asimismo, se llevó a cabo un estudio de RM-DTI (*diffusion tensor image*) evaluando propiedades de conectividad, estudio mediante tomografía de emisión de positrones (PET) y evaluación de los valores de anisotropía y difusibilidad, que establecen el grado de normalidad estructural del tejido cerebral. En los pacientes seleccionados tras esta valoración, se realizó una lobectomía selectiva. En el estudio se analizó tejido no afectado por el foco epiléptico primario. Por otra parte, se utilizó una muestra de un donante afectado por esclerosis múltiple correspondiente al área periventricular, cedido por el Biobanco de la Cleveland Clinic. Las características de los donantes se recogen en la Tabla 3. Tras su resección intraoperatoria o donación postmortem, todas las muestras fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído 4% en tampón fosfato 0,1 M (PB, pH 7,4) durante 48 h. Tras ello, fueron lavadas abundantemente con PB y se conservaron en azida sódica 0,05% en PB a 4 °C hasta el momento de su utilización. El procesamiento llevado a cabo para este trabajo, descrito a continuación, partió de este material. Asimismo, en la Fig. 5 se esquematiza el planteamiento metodológico empleado.

**Tabla 3. Sujetos de estudio.**

| Caso | Edad    | Lesión       | Localización                         | Cirugía                 | Fijación |
|------|---------|--------------|--------------------------------------|-------------------------|----------|
| 1    | 2 años  | DCF tipo IIA | Frontal derecha (AMS)                | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 2    | 5 años  | Sin lesión   | Frontobasal derecha (pars orbitalis) | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 3    | 6 años  | DCF tipo IA  | Temporal izquierda (T1-T2)           | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 4    | 9 años  | DCF tipo IA  | Temporal izquierda (T1-T2-T3)        | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 5    | 27 años | DCF tipo IIA | Insular anterior derecha             | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 6    | 32 años | DCF tipo IB  | Frontobasal derecha (pars orbitalis) | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 7    | 39 años | DCF tipo IIB | Frontal izquierda (F2)               | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 8    | 44 años | DCF tipo IIB | Frontal derecha (AMS)                | Craneotomía y resección | PFA 4%   |
| 9    | 59 años | EM (EDSS 9)  | Muestra periventricular              | Craneotomía y resección | PFA 4%   |

Nota: DCF, displasia cortical focal.



**Figura 5. Esquema del planteamiento metodológico desarrollado.**

### 3.2 Diseño experimental

Los sujetos de estudio se dividieron en dos grupos experimentales, uno de ellos compuesto por individuos adultos ( $n = 4$ , edades comprendidas entre 27 y 44 años) y un segundo grupo compuesto por sujetos pediátricos ( $n = 4$ , edades 2 a 9 años). La muestra procedente de una paciente de esclerosis múltiple (59 años) no se asignó a ninguno de estos dos grupos experimentales, sino que se estudió de forma descriptiva de forma independiente por no contar con un suficiente número de muestras para realizar análisis estadísticos.

### 3.3 Detección inmunohistoquímica

Las muestras fueron deshidratadas en concentraciones crecientes de etanol y xileno: etanol 70%, 96%, 100% (I), 100% (II), xileno-etanol, xileno (I), xileno (II), 90 min por paso. Posteriormente se incubaron en parafina (I) durante 2 h y toda la noche en parafina (II) en vacío a 60 °C. Una vez incluidas las muestras, se obtuvieron secciones de 5  $\mu\text{m}$  en un micrótomó. Para la detección marcadores moleculares por inmunofluorescencia, se desparafinaron los cortes en una estufa durante 1 hora a 60 °C, se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol y se realizó un desenmascaramiento de antígenos con Immunosaver (1:200, Electron Microscopy Sciences) durante 20 minutos en una olla a presión. Tras el atemperado y el lavado de las muestras con PB 0,1 M se bloquearon las peroxidasas endógenas mediante una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  3% y metanol 10% en PB 0,1 M durante 15 min a temperatura ambiente y en oscuridad. Después, se lavaron las secciones con una solución de Triton X-100 0.1% y albúmina de suero bovino 0,1% en tampón fosfato salino 0,1 M (PTA) y se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas del anticuerpo mediante incubación en caseína 1% y suero de cabra 5% en PTA. Posteriormente, se incubaron las muestras con los anticuerpos primarios (Tabla 4) durante toda la noche a 4 °C en agitación. Al día siguiente, se lavaron las muestras con PTA y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados a fluoróforos (Tabla 5) durante 1 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras lavar con PB 0,1 M y con agua destilada, las muestras se incubaron con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 300 nM en agua destilada durante 5 minutos para el marcaje nuclear de las células. Finalmente, tras el lavado con PB 0,1 M, se llevó a cabo el montaje de las secciones con FluorSave<sup>TM</sup> (Millipore).

Para la detección inmunohistoquímica de BCAS1 con 3,3'-diaminobenzidina (DAB), las secciones se procesaron del mismo modo descrito para la detección mediante inmunofluorescencia salvo que, en este caso, se llevó a cabo una incubación con un anticuerpo secundario biotinilado (Tabla 5). Tras la incubación con anticuerpo secundario, se llevó a cabo una amplificación de la señal mediante el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, Vector) durante 1 h y se reveló durante 8 minutos con una solución de DAB 0,05%,  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,003% en PB

0,1 M, todo ello a temperatura ambiente. Por último, los cortes fueron deshidratados con concentraciones crecientes de etanol y aclarados en xileno para finalmente ser montados con Eukitt.

Una vez montadas las muestras, estas fueron examinadas usando un microscopio Nikon Eclipse 80i y se obtuvieron fotomicrografías usando una cámara digital Nikon CCD DS-Qi1Mc.

### **3.4 Detección por inmuno-oro**

En primer lugar, se obtuvieron secciones coronales de 50  $\mu\text{m}$  con un vibratomo Leica VT1000S. Las secciones fueron crioprotegidas por inmersión en sacarosa 25% en PB 0,1 M durante 30 min y posteriormente se permeabilizaron mediante congelación y descongelación repetida (3-4 veces) en metilbutano a  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en BSAc 3% (Aurion) para bloquear uniones inespecíficas. Tras ello, se incubaron con anticuerpo primario (ratón anti-BCAS1, conejo anti-NG2 y conejo anti-Olig2, Tabla 4) diluido en la solución anterior durante 72 h a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Una vez finalizado este proceso, las secciones fueron lavadas abundantemente en PB 0,1 M e incubadas en BSAc 5%, gelatina de pescado 1% (Aurion) en PB 0,1 M durante 1 h a temperatura ambiente. Acto seguido, se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (cabra anti-ratón IgG y cabra anti-conejo IgG, 1:50, conjugados a partículas de oro de 0,8 nm, Aurion; Tabla 5) durante 24 h a  $4^{\circ}\text{C}$ . Tras ello se lavaron con PB 0,1 M, acetato sódico 2% y se llevó a cabo un proceso de intensificación con plata para aumentar el tamaño del grano de oro mediante un kit y siguiendo las instrucciones del fabricante (Aurion R-Gent SE-LM). Posteriormente se realizaron lavados con acetato sódico 2% y se incubaron las muestras durante 10 min con cloruro de oro 0,05% en agua para estabilizar los complejos oro-plata formados. Después se sumergieron las secciones en tiosulfato sódico 0,3% durante 20 min y se postfijaron con glutaraldehído 2% en PB 0,1 M durante 30 min. Por último, las muestras se lavaron en PB 0,1 M y se conservaron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  en azida sódica 0,05% en PB 0,1 M hasta el momento de su inclusión en resina.

### **3.5 Microscopía electrónica de transmisión**

Las secciones derivadas del proceso de detección por inmuno-oro fueron incluidas en resina epoxy para la obtención de cortes ultrafinos y su posterior estudio mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello, las secciones fueron contrastadas con tetraóxido de osmio 1% en PB 0,1 M durante 30 min, lavadas con agua, deshidratadas parcialmente en soluciones de concentración creciente de etanol y contrastadas con acetato de uranilo 2% en etanol 70% durante 2 h 30 min. A continuación, se completó el proceso de deshidratación hasta etanol 100% y las muestras se incubaron con óxido de propileno como agente aclarante. En ese momento las muestras fueron transferidas rápidamente a moldes de papel de aluminio que contenían resina



epoxy Durcupan (Fluka). Una vez sumergidas en resina, las muestras se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación para permitir su infiltración. Al día siguiente, las muestras se transfirieron a moldes creados con láminas de acetato y se incubaron 72 h a 70 °C para la polimerización de la resina. Una vez fraguada esta resina, se obtuvieron secciones ultrafinas (70-80 nm) mediante una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Leica Ultracut UC7. Las secciones se colocaron sobre rejillas de cobre recubiertas con Formvar y se contrastaron con citrato de plomo (solución de Reynolds). A continuación, se analizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión FEI Tecnai G<sup>2</sup> Spirit equipado con una cámara digital Morada (Olympus).

**Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios usados.**

|           | Anticuerpo | Especie y dilución | Casa comercial         | Especificidad  |
|-----------|------------|--------------------|------------------------|--|
| PRIMARIOS | BCAS-1     | Ratón, 1:200       | Santa Cruz (SC-136342) | Preoligodendrocitos y oligodendrocitos inmaduros mielinizantes |
|           | NG2        | Conejo, 1:200      | Millipore (AB5320)     | OPC y preoligodendrocitos                                      |
|           | Olig2      | Conejo, 1:300      | Chemikon (AB9610)      | Oligodendrocitos (desde OPC hasta oligodendrocitos maduros)    |
|           | GFAP       | Ratón, 1:200       | Merck-Millipore        | Filamentos intermedios en astrocitos                           |
|           | PDGFRa     | 1:50               | BD Biosciences         | OPC y preoligodendrocitos                                      |
|           | MBP        | Rata, 1:100        | Abcam                  | Proteína asociada a la mielina                                 |
|           | MAG        | Ratón, 1:100       | Merck-Millipore        | Glicoproteína asociada a la mielina                            |

**Tabla 5. Lista de anticuerpos secundarios usados.**

|             | Anticuerpo       | Especie y dilución | Casa comercial (referencia) | Marcaje     |
|-------------|------------------|--------------------|-----------------------------|-------------|
| SECUNDARIOS | Anti-ratón, IgG  | Cabra, 1:500       | Invitrogen (A11001)         | Alexa 488   |
|             | Anti-conejo, IgG | Cabra, 1:500       | Invitrogen (A21428)         | Alexa 555   |
|             | Anti-rata, IgG   | Cabra, 1:500       | Invitrogen (A11006)         | Alexa 488   |
|             | Anti-ratón, IgG  | Cabra, 1:500       | Vector (BA-9200)            | Biotinilado |
|             | Anti-ratón, IgG  | Cabra, 1:50        | Aurion (25120)              | Oro 0,8 nm  |
|             | Anti-conejo, IgG | Cabra, 1:50        | Aurion (25100)              | Oro 0,8 nm  |

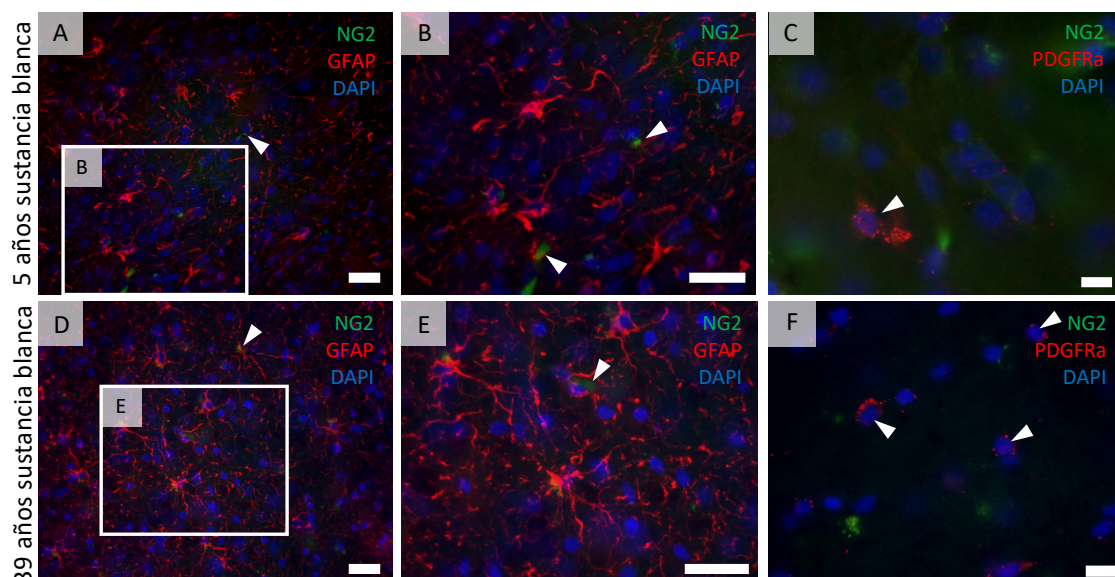
### 3.5 Cuantificación y análisis estadístico

Para la cuantificación de la densidad celular del marcador BCAS1 se contabilizó, de forma ciega, el número de células positivas para dicho marcador por unidad de superficie en cinco niveles anteroposteriores por sujeto ( $n = 3$  por grupo experimental). Las secciones analizadas correspondían a distintas zonas de la sustancia blanca cortico-subcortical y se procesaron mediante inmunohistoquímica con DAB. Los datos resultantes se expresaron como la media  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) y se realizó un análisis estadístico mediante GraphPad Prism versión 9.1.0 para Mac (GraphPad Software, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). En primer lugar, se comprobó la normalidad de la muestra usando la prueba de Kolgomorov-Smirnov. A continuación, se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para determinar si existían diferencias significativas en el número de OL BCAS1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> entre los dos grupos experimentales analizados. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias con  $p$ -valores  $< 0,05$ .

## 4. Resultados

### 4.1 Estudio de la dinámica temporal de la población celular BCAS1<sup>+</sup> en muestras adultas y pediátricas de tejido cerebral humano

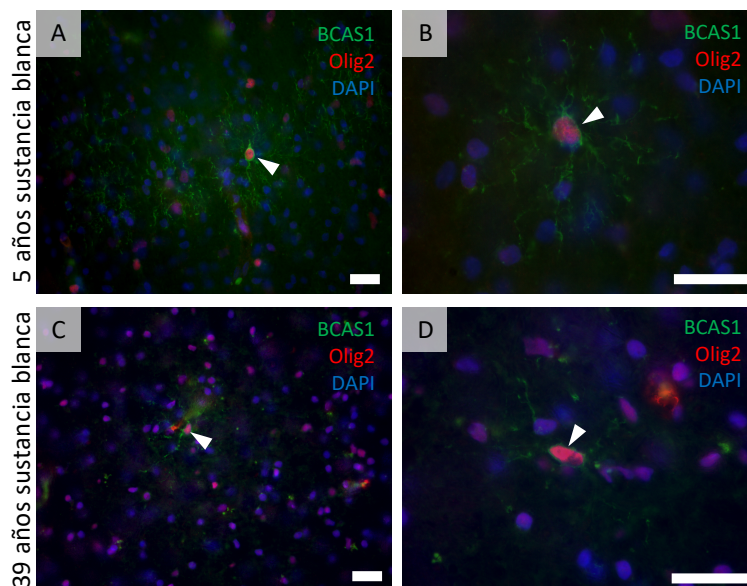
Con el fin de detectar posibles diferencias en la dinámica de maduración del linaje oligodendroglial en cerebros humanos en edad infantil (2 a 9 años; n = 4) respecto a aquellos en edad adulta (27 a 44 años; n = 4), llevamos a cabo una detección por inmunofluorescencia de marcadores moleculares característicos de diferentes etapas madurativas de los OL. Para identificar OPC en estadios tempranos de diferenciación empleamos los marcadores NG2 y PDGFR- $\alpha$ . Adicionalmente, empleamos el marcador GFAP, expresado por astrocitos, para poder descartar precursores astrocíticos (NG2<sup>+</sup>/GFAP<sup>+</sup> y morfológicamente similares) en nuestro estudio. Los dos grupos de edad analizados presentaban una distribución dispersa pero ubicua tanto de OPC (células NG2<sup>+</sup> y PDGFR- $\alpha$ <sup>+</sup>) como de astrocitos (células GFAP<sup>+</sup>) en la sustancia blanca (Fig. 6). No obstante, en ocasiones se observaron pequeñas agrupaciones de OPC que normalmente no superaban las cinco células. Aunque se encontraron células doblemente marcadas (NG2<sup>+</sup>/PDGFR- $\alpha$ <sup>+</sup>), también encontramos células positivas únicamente para alguno de estos dos marcadores, sugiriendo que existe una transición entre diferentes estadios de maduración. Estos resultados confirman que el cerebro humano mantiene una población de OPC inmaduros incluso en edades adultas y que la distribución y organización de dichas células no cambia de manera notable con la edad.



**Figura 6. Detección por inmunofluorescencia de diversos marcadores gliales.** A–C) Imágenes de tejido cerebral de un donante de 5 años. D–F) Imágenes de tejido cerebral de un donante de 39

años de edad. En ambos casos se observa una distribución ubicua de células gliales de morfología estrellada que pueden ser distinguidas por la expresión del marcador astroglial GFAP, o bien por la expresión de NG2 y/o PDGFR- $\alpha$ , dos marcadores de OPC. No se observan diferencias notables en cuanto al patrón de distribución de ambos tipos celulares entre la edad pediátrica y adulta. Barras de escala: 10  $\mu$ m.

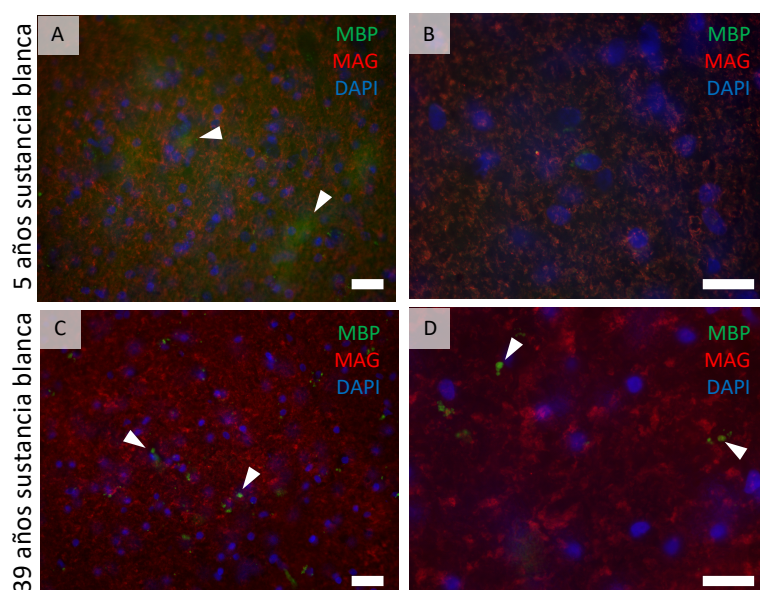
A medida que las células oligodendrogliales avanzan en su proceso madurativo, estas dejan de expresar NG2 y PDGFR- $\alpha$  paulatinamente, comenzando a expresar otros marcadores típicos de OL (14). Para detectar los estadios intermedios de maduración oligodendrogliar realizamos un doble inmunomarcaje con Olig2, específico del linaje oligodendrogliar y presente en todas las etapas madurativas, en combinación con BCAS1, expresado por pre-oligodendrocitos y OL premielinizantes. Los dos grupos de edad estudiados (infantil y adulto) mostraron una distribución celular homogénea en la sustancia blanca, sin cambios aparentes entre ambos grupos en cuanto a la distribución o la organización de células BCAS1<sup>+</sup>. Mientras que las células doblemente positivas BCAS1<sup>+</sup>/Olig2<sup>+</sup> representan estadios madurativos más precoces, concordante con las numerosas prolongaciones ramificadas que presentaban, las células BCAS1<sup>-</sup>/Olig2<sup>+</sup> corresponderían a una fase más madura, presentando una morfología más compacta en las muestras analizadas (Fig. 7).



**Figura 7. Detección por inmunofluorescencia de marcadores específicos del linaje oligodendrogliar en estadios de maduración intermedios.** A y B) Imágenes de tejido cerebral de un donante de 5 años de edad. C y D) Imágenes de tejido cerebral de un donante de 39 años de edad. En ambos casos, las células BCAS1<sup>+</sup> (verde) colocalizaron con el marcador del linaje oligodendrogliar Olig2 (rojo). Las flechas señalan ejemplos de células BCAS1<sup>+</sup>/Olig2<sup>+</sup>. Dichas

células presentaban una morfología estrellada, a diferencia de las células BCAS1<sup>-</sup>/Olig2<sup>+</sup>, más maduras y con una morfología más compacta. Barras de escala: 25 μm.

Por último, investigamos la presencia de marcadores de OL maduros en las muestras de ambos grupos de edad. Para ello decidimos detectar MAG y MBP, proteínas asociadas a la mielina y, por ende, marcadores indirectos de OL maduros con capacidad mielinizante. A pesar de haber encontrado señal fluorescente correspondiente a tractos de axones mielínicos en ambos grupos de edad, la detección de los marcadores empleados no ofreció una visión morfoestructural de la mielina ni la asociación de esta con los OL adyacentes (Fig. 8). Por esta razón, recurrimos a técnicas de microscopía electrónica en combinación con detección inmunohistoquímica.



**Figura 8. Detección por inmunofluorescencia de proteínas asociadas a la mielina, características de oligodendrocitos maduros.** A–B Imágenes de tejido cerebral de un donante de 5 años. C–D) Imágenes de tejido cerebral de un donante de 39 años de edad. En ambos casos la expresión de MBP (verde, flechas) y MAG (rojo), se asocia a OL en estadios de maduración tardía. Resulta complicado relacionar el marcaje observado con las células adyacentes. Barras de escala: 10 μm.

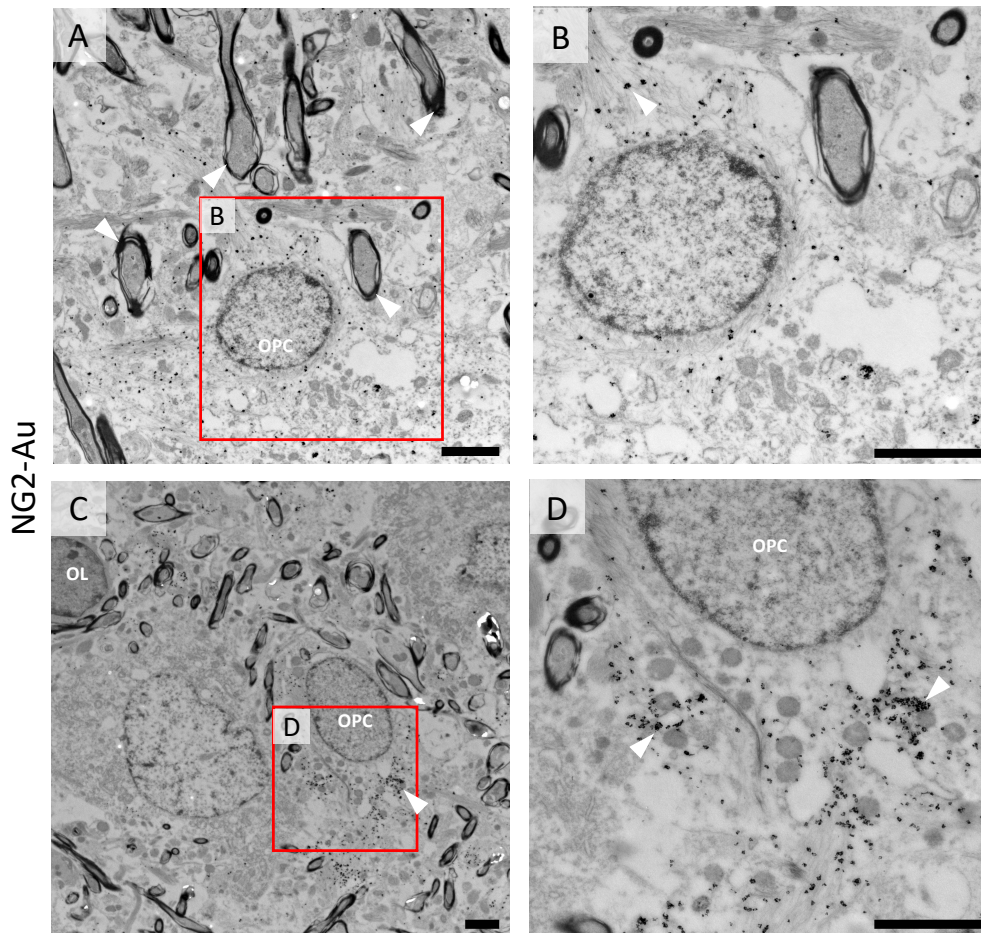
#### 4.2 Caracterización ultraestructural del linaje oligodendroglial y de la población BCAS1<sup>+</sup>

Con el fin de analizar en más detalle cambios asociados a la edad en la citoarquitectura, composición subcelular y los contactos establecidos con estructuras vecinas de las células del linaje oligodendroglial, llevamos a cabo detecciones por inmuno-oro seguidas de análisis mediante microscopía electrónica de transmisión. La detección por inmuno-oro es una técnica similar a la inmunohistoquímica clásica, que emplea un anticuerpo secundario conjugado a



partículas de oro de muy pequeño tamaño (0,8 nm) visibles en un microscopio óptico de transmisión.

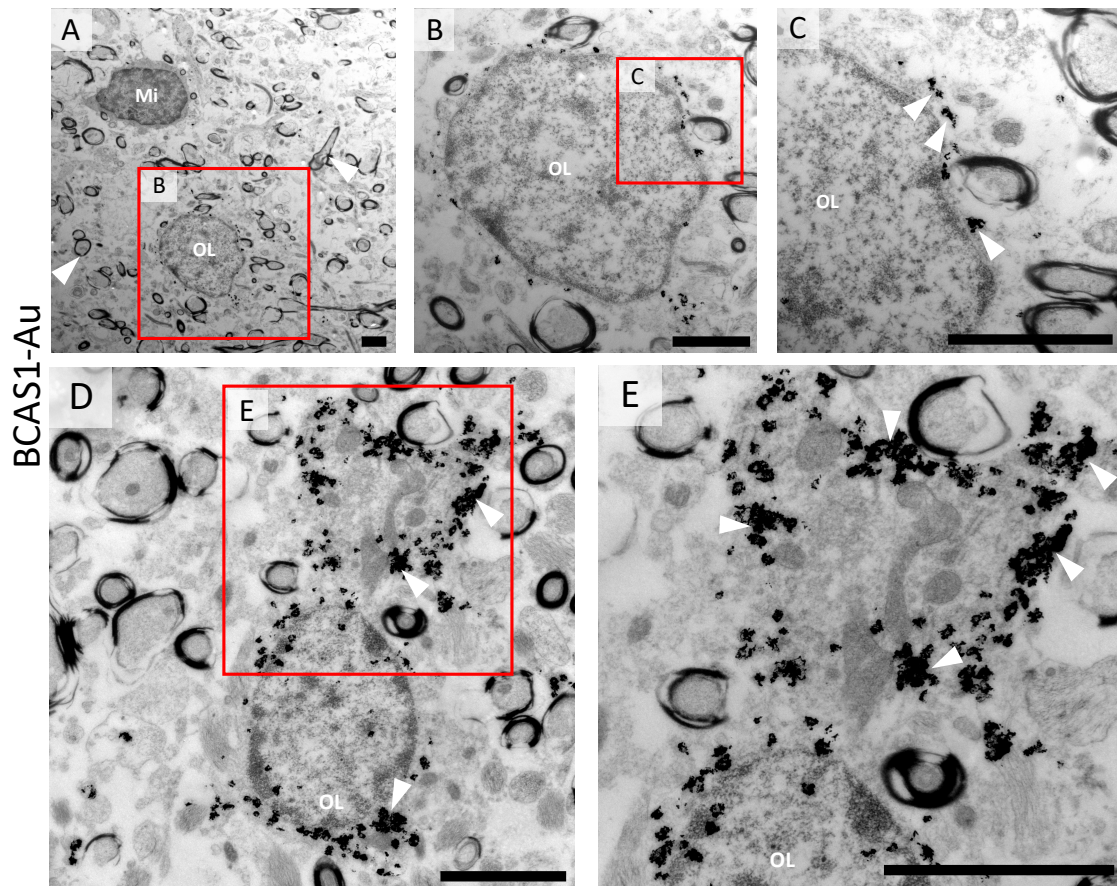
Siguiendo el planteamiento anterior, en primer lugar identificamos OPC mediante el marcador NG2<sup>+</sup>. Las OPC NG2<sup>+</sup> presentaban núcleo irregular y escasos procesos citoplasmáticos. Pese a las evidentes diferencias morfológicas con los oligodendrocitos maduros, estas OPC presentaban algunas características subcelulares comunes del linaje oligodendroglial, como cisternas de retículo endoplásmico rugoso cortas y dilatadas (Fig. 9A-B) (121). En la proximidad de las células NG2<sup>+</sup> encontramos también células negativas para este marcador, que sin embargo estaban íntimamente asociadas a axones mielínicos. Su morfología compacta, citoplasma escaso y oscuro (electrodens), y su núcleo esférico con abundantes grumos de heterocromatina, sugieren su pertenencia a estadios madurativos más avanzados del linaje oligodendroglial (Fig. 9B-C).



**Figura 9. Detección por inmuno-oro de células progenitoras de oligodendrocitos NG2<sup>+</sup> en la sustancia blanca humana de un donante de 6 años de edad. A) Imagen de microscopía electrónica de transmisión a baja magnificación. Se puede observar una célula NG2<sup>+</sup> localizada en la sustancia blanca rodeada de axones mielínicos cortados transversal y tangencialmente (flechas). B) Detalle de la OPC anterior donde se observan agregados de oro-plata en el**

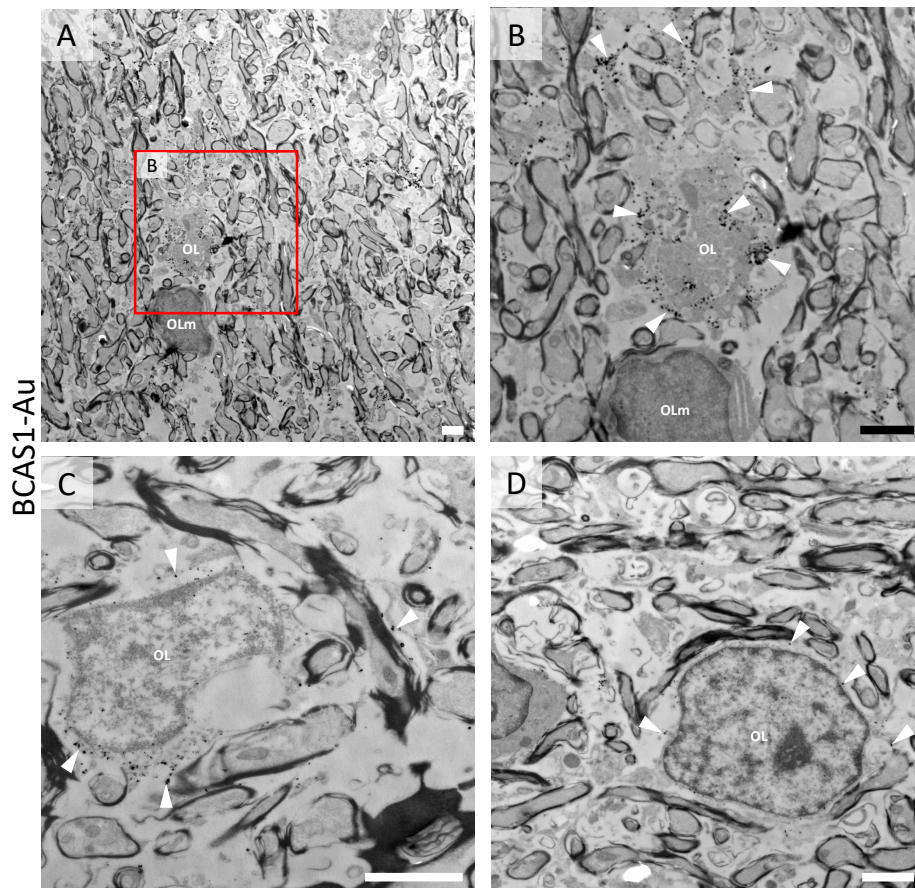
citoplasma celular, correspondientes al marcaje para NG2 (flechas). C) Imagen a bajos aumentos donde se observa un oligodendrocito maduro (OL) NG2<sup>-</sup> en la esquina superior izquierda, caracterizado por su citoplasma más oscuro (electrodensos), núcleo esférico con abundante heterocromatina y escaso citoplasma. En la parte central se observa un OPC NG2<sup>+</sup> (flechas, derecha) y otra célula de mayor tamaño, NG2<sup>-</sup> (a la izquierda). La presencia de cisternas de retículo endoplásmico cortas y dilatadas en esta última sugiere su pertenencia al linaje oligodendroglial. D) Detalle del marcaje NG2 en el citoplasma de la OPC mostrada en el panel anterior. Las flechas indican el marcaje con oro-plata. Barras de escala: 2 μm.

Para identificar OPC en estadios intermedios de maduración, detectamos la expresión del marcador BCAS1. Hasta la fecha no se conoce con exactitud la localización subcelular de dicha proteína en las OPC. En nuestro estudio observamos, de forma constante, que la localización de la marca para BCAS1 estaba mayoritariamente localizada en la membrana plasmática, con escasa presencia en otros espacios celulares como citoplasma o núcleo (Fig. 10A-C; Fig. 11). A nivel ultraestructural, las células BCAS1 mostraban una asociación más evidente a axones mielínicos que las células NG2<sup>+</sup>, sugiriendo una fase de maduración más avanzada. Además, las células BCAS1<sup>+</sup>, presentaban un tamaño ligeramente superior y mayor complejidad celular que estadios madurativos más tempranos, evidenciados por una mayor presencia de orgánulos y expansiones citoplasmáticas más abundantes e intrincadas. El núcleo celular, además, presentaba una morfología más redondeada y con mayor presencia de heterocromatina que en las células NG2<sup>+</sup> descritas anteriormente (Fig. 10D-E). De nuevo, no se observaron diferencias notables entre las células BCAS1<sup>+</sup> presentes en el cerebro de donantes en edad pediátrica y adulta (Figs. 10 y 11). No obstante, en las muestras de edad adulta, debido a su mayor grado de mielinización, eran más evidentes las diferencias entre oligodendrocitos premyelinizantes (BCAS1<sup>+</sup>) y oligodendrocitos maduros (BCAS1<sup>-</sup>) (Fig. 11A-C). Curiosamente, en muestras adultas encontramos ocasionalmente células BCAS1<sup>+</sup> con una morfología más compacta de lo habitual, núcleo redondeado y un patrón de cromatina intermedio entre estadios inmaduros y maduros, pudiendo representar estas células las últimas etapas de maduración antes de convertirse en OL maduros (Fig. 11D). No obstante, en general concluimos que la ultraestructura y organización celular de los OPC en estadios intermedios de maduración era semejante entre los grupos de edad infantil y adulto estudiados y que la expresión de la proteína BCAS1 aparece predominantemente localizada en la membrana citoplasmática.



**Figura 10. Detección por inmuno-oro de oligodendrocitos premielinizantes BCAS1<sup>+</sup> en la sustancia blanca humana de un donante de 6 años de edad.** A) Imagen panorámica en la que se muestra una célula de microglía (Mi), en la parte superior izquierda, reconocible por su citoplasma oscuro, contorno irregular y gránulos de heterocromatina en el núcleo, siendo negativa para el marcador BCAS1; en la parte inferior se observa un oligodendrocito inmaduro BCAS1<sup>+</sup>. B y C) Detalle del marcaje BCAS1 (flechas) asociado a la membrana plasmática. Dicho marcador se expresa en estadios de maduración intermedios en el linaje oligodendrogliar, donde ya puede observarse cierta asociación a la mielina de axones adyacentes. D y E) Ejemplo de otro oligodendrocito premielinizante BCAS1<sup>+</sup> (flechas). Estas células presentan mayor variedad y abundancia de orgánulos que estadios de maduración anteriores, siendo características las cisternas de retículo endoplásmico rugoso cortas y dilatadas, al igual que en el resto de células del linaje oligodendrogliar. Barras de escala: 2  $\mu$ m.

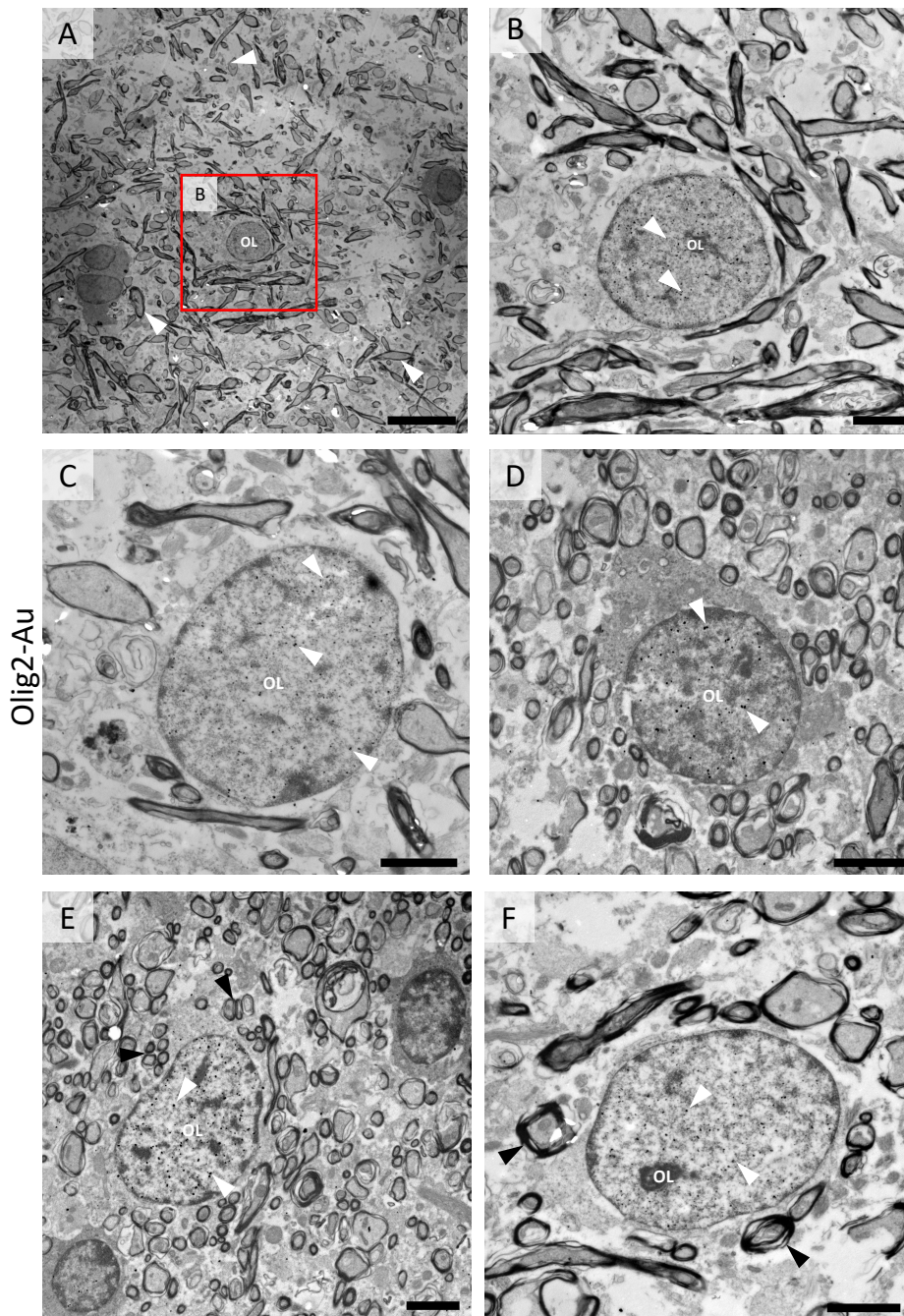




**Figura 11. Detección por inmuno-oro de oligodendrocitos premielinizantes BCAS1<sup>+</sup> en la sustancia blanca humana de un donante de 39 años de edad.** A) Imagen panorámica en la que se muestra una célula BCAS1<sup>+</sup> (OL) y un oligodendrocito maduro (OLm), con citoplasma más electrodenso e íntimamente asociado a axones mielínicos. B) Detalle de las células mostradas en el panel anterior. C) Ejemplo de oligodendrocito premielinizante con marca para BCAS1 incluso alrededor de la vaina de mielina que recubre a los axones adyacentes. D) Oligodendrocito BCAS1<sup>+</sup> con morfología compacta e íntima asociación a axones mielínicos. Las flechas indican marca para BCAS1 en todos los casos. Barras de escala: 2  $\mu$ m.

Durante su proceso madurativo, el cuerpo celular de los OL premielinizantes se torna paulatinamente más compacto y su citoplasma más electrodenso; aumentan el retículo endoplásmico rugoso con cisternas más cortas y dilatadas, el complejo de Golgi, las mitocondrias y microtúbulos a medida que adquieren mayor capacidad metabólica (121). Para caracterizar ultraestructuralmente este estadio terminal de maduración recurrimos a la detección de la expresión del factor de transcripción Olig2 cuya expresión es exclusiva del linaje oligodendroglial. Basándonos en la identificación de todas las células Olig2<sup>+</sup>, es decir, de OL en distintas etapas del proceso madurativo, analizamos las posibles diferencias asociadas a la edad junto con los cambios ultraestructurales descritos y característicos de cada fase madurativa. Para

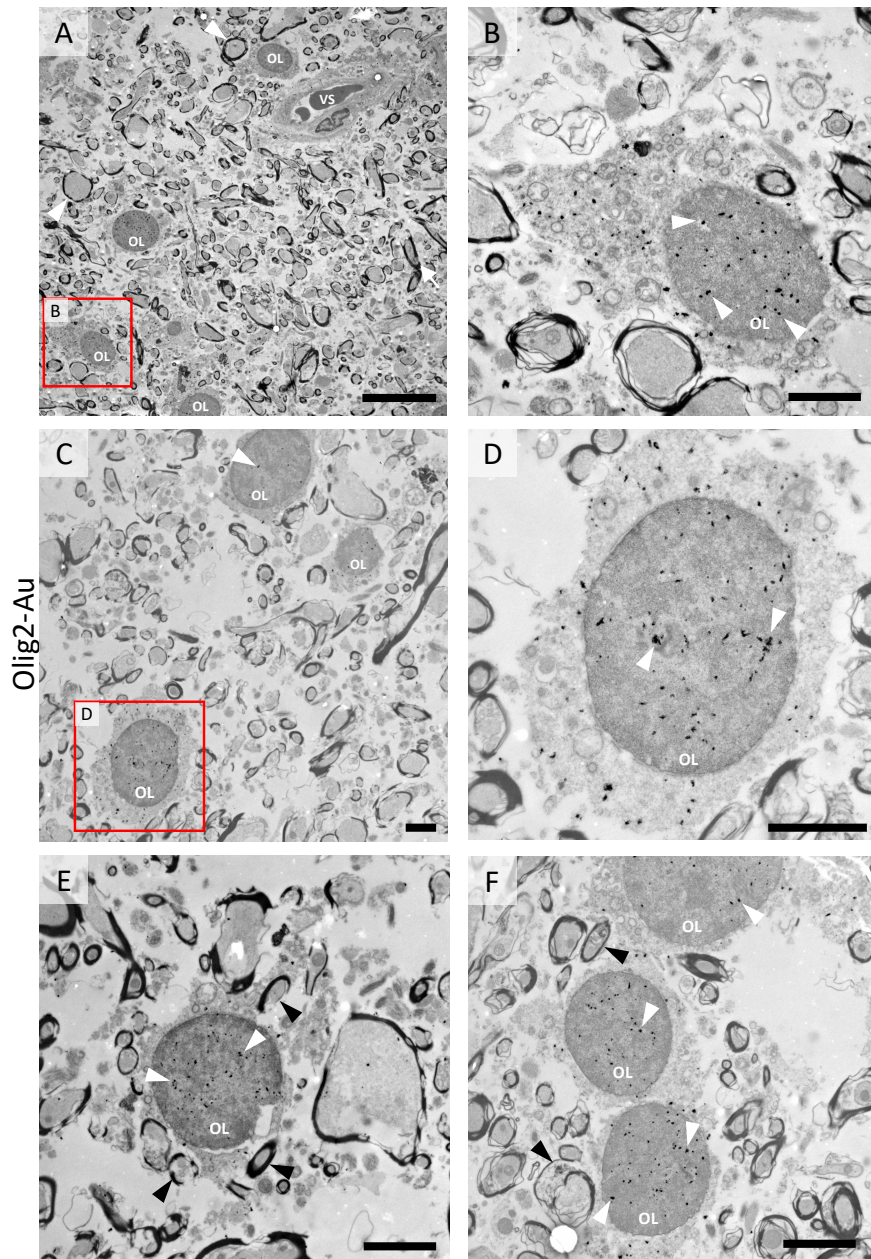
ello, comparamos las muestras de nuestro grupo de edad pediátrica con el de edad adulta. En ambos casos observamos que la mayor parte de células marcadas con Olig2, de localización nuclear, correspondían a células con las características ultraestructurales de oligodendrocitos maduros anteriormente señaladas. De forma concordante con lo observado en etapas madurativas más tempranas, tampoco se observaron en este caso diferencias relevantes entre las muestras de donantes en edad infantil y adulta (Figs. 12 y 13).



**Figura 12. Detección por inmuno-oro de Olig2 en células del linaje oligodendroglial en la sustancia blanca humana de un donante en edad pediátrica de 9 años. A) Imágenes de baja**



magnificación en las que se observa la apariencia típica de la sustancia blanca cerebral, con abundantes axones mielínicos (flechas) en diversas orientaciones y un oligodendrocito maduro (OL) en la parte central de la imagen. B) Detalle del oligodendrocito anterior mostrando el patrón nuclear de punteado fino correspondiente a la expresión del factor de transcripción Olig2 (flechas). C–F) Imágenes representativas de células Olig2<sup>+</sup> (marcaje señalado con flechas blancas) con axones mielínicos (flechas negras) asociados a sus procesos citoplasmáticos. Barras de calibración: A, 10 μm; resto de imágenes, 2 μm.



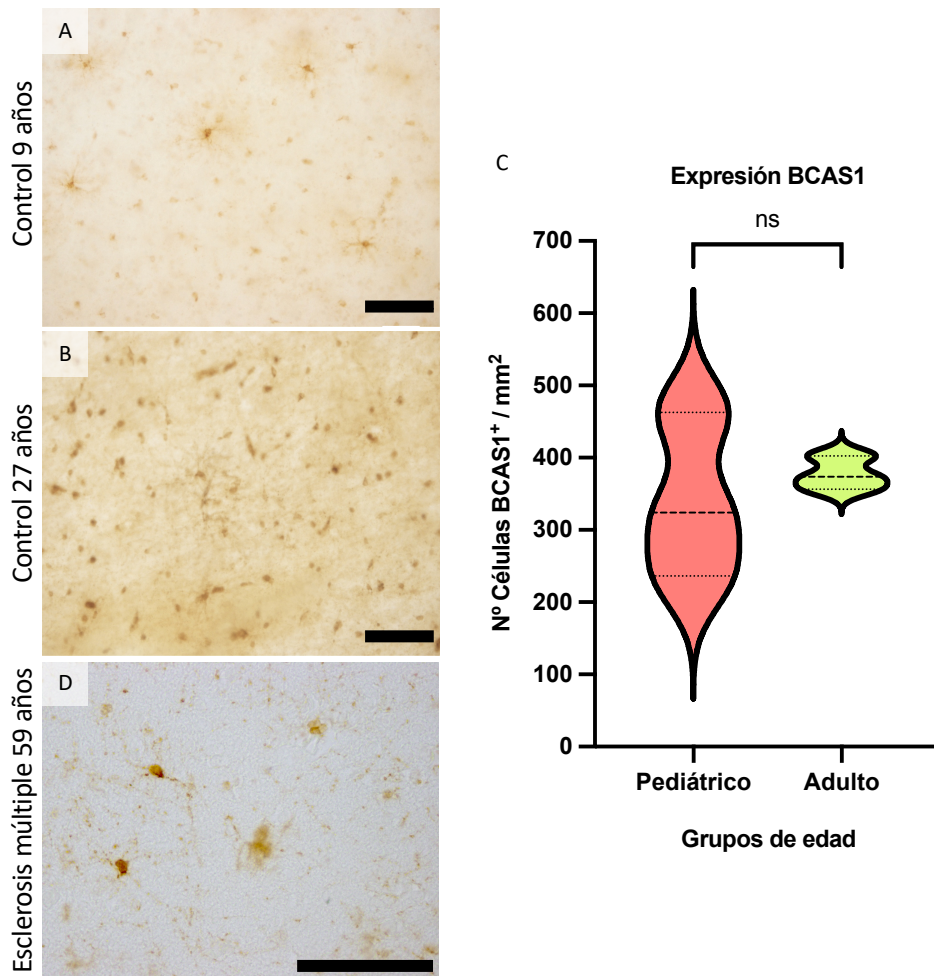
**Figura 13.** Detección por inmuno-oro de Olig2 en células del linaje oligodendroglial en la sustancia blanca humana de un donante de 44 años de edad. A) Imagen panorámica en la que

se observan axones mielínicos de distintos diámetros (flechas), un vaso sanguíneo (VS) y múltiples células del linaje oligodendroglial (OL) Olig2<sup>+</sup>. B–D) Imágenes a mayor magnificación en las que se muestra la inmunorreactividad para el marcador nuclear Olig2 (flechas), expresado en preoligodendrocitos, con mayor área citoplasmática que los oligodendrocitos maduros mostrados en E y F. E y F) Oligodendrocitos en etapas terminales de maduración con citoplasma más compacto y electrodenso, y una asociación más íntima a los axones mielínicos adyacentes. Barras de escala: A, 10  $\mu\text{m}$ ; resto de imágenes, 2  $\mu\text{m}$ .

### **4.3 Cuantificación de la densidad celular de la población BCAS1<sup>+</sup> en tejido cerebral pediátrico y adulto sano y presencia de células BCAS1<sup>+</sup> en muestras de esclerosis múltiple**

Con el fin de detectar posibles diferencias en la densidad celular de células BCAS1<sup>+</sup> asociadas a la edad, cuantificamos el número de células BCAS1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> en muestras de donantes en edad pediátrica y adulta (n = 3 por grupo de edad). Para ello, llevamos a cabo una detección inmunohistoquímica mediante DAB y posterior cuantificación de las células BCAS1<sup>+</sup> en la sustancia blanca. En el grupo de edad pediátrica se contabilizaron  $341 \pm 65,89$  células BCAS1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SEM), mientras que en el de edad adulta se cuantificaron  $377,6 \pm 13,4$  células BCAS1<sup>+</sup>/mm<sup>2</sup>. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas en la densidad celular de la población BCAS1<sup>+</sup> entre ambos grupos de edad (test de Mann-Whitney, *p*-valor = 0,7). Estos resultados sugieren que, de acuerdo con lo observado mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica, no existen diferencias notables en la dinámica de maduración del linaje oligodendroglial entre la edad infantil y adulta en la sustancia blanca del cerebro humano (Fig. 14A-C).

Por último, nos preguntamos si la población de células BCAS1<sup>+</sup> podría estar, de algún modo, alterada en pacientes de EM. Si bien tan solo tuvimos acceso a una muestra de una donante afectada por esta patología, a nivel descriptivo no observamos grandes diferencias en cuanto a la morfología de las células BCAS1<sup>+</sup> en la muestra de EM respecto a la de donantes que no padecían EM. Sin embargo, y de forma interesante, sí que se percibió (a nivel cualitativo) una menor densidad de células BCAS1<sup>+</sup> en la muestra de EM (Fig. 14C) al compararla con las de donantes control en edad pediátrica (Fig. 14A) y adulta (Fig. 14B).



**Figura 14. Detección inmunohistoquímica de BCAS1 en la sustancia blanca de donantes pediátricos, adultos y en una paciente de esclerosis múltiple.** A) Imagen representativa de la distribución de células BCAS1<sup>+</sup> en la sustancia blanca cerebral de un niño de 9 años. B) Células BCAS1<sup>+</sup> en la sustancia blanca cerebral de un donante adulto de 27 años. C) Cuantificación de la densidad de células BCAS1<sup>+</sup> en donantes en edad pediátrica y adulta ( $p = 0.7$ , U de Mann-Whitney;  $n = 3$  por grupo de edad). D) Sustancia blanca de una paciente de esclerosis múltiple de 59 años de edad. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ .

## 5. Discusión

### 5.1 Dinámica de la maduración del linaje oligodendroglial en el cerebro humano

El sistema nervioso es uno de los tejidos con menor capacidad de reparación del cuerpo humano, probablemente debido a su alto grado de especialización. No obstante, desde el descubrimiento relativamente reciente de la existencia de células madre neurales en el cerebro adulto de muchos mamíferos, se han depositado grandes esperanzas en la reversión de patologías neurodegenerativas (122). En el caso concreto de las patologías desmielinizantes y, en especial, de la EM, se han identificado dos fuentes potenciales de OL con capacidad de reparar la mielina tras una lesión. La primera de ellas comprende las OPC generadas durante el desarrollo fetal y persistentes en el cerebro adulto, que suponen un 5% del total de las células del cerebro humano (18). La segunda fuente de OPC deriva de las células madre neurales presentes en los nichos neurogénicos, especialmente en la ZV-SV (71). Publicaciones recientes destacan el potencial migratorio y la capacidad remielinizante de estas células (7,27).

Este trabajo pretende aportar mayor evidencia a la bibliografía ya existente respecto a la generación de OPC a partir de células NG2<sup>+</sup> y su potencial desarrollo hacia células del linaje oligodendroglial, no solo en la ZV-SV sino en el resto de sustancia blanca cerebral e independientemente de la edad del individuo (8,123). Aunque nuestro planteamiento ya había sido explorado en la sustancia blanca de cerebro adulto, hasta donde sabemos no existen trabajos que hayan evaluado la presencia de OPC y OL en estadios madurativos intermedios (BCAS1<sup>+</sup>) en tejido cerebral humano que incluyan individuos pediátricos en su investigación.

Hemos observado, mediante detección por inmunofluorescencia, que la expresión de marcadores moleculares característicos de las distintas fases madurativas del linaje oligodendroglial es similar en edades pediátricas y adultas. Mediante microscopía electrónica de transmisión y marcaje con inmuno-oro observamos la citoarquitectura, los cambios a nivel subcelular y la localización de los distintos marcadores empleados. Se incluyó el marcador de OPC tempranos NG2, el marcador de OPC en estadios intermedios de maduración BCAS1, y se estudiaron células con morfología de OL maduros Olig2<sup>+</sup>. Dicha evaluación tampoco reveló diferencias considerables entre las muestras de donantes en edad pediátrica y adulta analizadas. Por ello, hipotetizamos que existe un reservorio de OPC en el cerebro humano que persiste desde la edad infantil hasta la edad adulta, y que la maduración de esas OPC hacia OL maduros podría suponer una forma de mantener cierta capacidad de remodelación de la mielina, tanto en situaciones fisiológicas como ante lesiones desmielinizantes. Esta idea ha sido apoyada por otros

estudios anteriores (9,14,19,20), si bien serían necesarias nuevas evidencias que ayuden a explicar los factores que intervienen en la activación de dicho proceso.

## **5.2 Población BCAS1<sup>+</sup> en el cerebro humano en edad infantil y adulta**

Con el fin de objetivar los resultados descriptivos obtenidos mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica tras detección por inmuno-oro, llevamos a cabo una cuantificación de la densidad celular de la población BCAS1<sup>+</sup>, correspondiente a OL en etapas intermedias de maduración. Se compararon muestras de donantes en edad pediátrica y en edad adulta sin encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. Puesto que ha sido descrito un recambio anual de OL de aproximadamente 1/300 células (9), el mantenimiento de una población de OPC constante entre la edad infantil y adulta requeriría un aporte de nuevas células que compensen la desaparición de OPC por diferenciación a OL maduros. Una posible explicación sería el aporte de nuevas OPC a partir de células madre neurales situadas en la ZV-SV. A pesar de que se tiene constancia de la capacidad oligodendrogénica de la ZV-SV, especialmente en su parte dorsal (84), no existe información sobre el impacto que dicho aporte pueda tener sobre el mantenimiento de la población de OPC en todo el cerebro. Tradicionalmente se ha considerado que las OPC generadas en la ZV-SV migrarían hacia el cuerpo calloso y al estriado, regiones cercanas al dicho nicho (70,71). Sin embargo, no es descartable que la capacidad migratoria de las OPC permita que estas células alcancen otras regiones cerebrales más alejadas.

Nuestro análisis cuantitativo sobre la población BCAS1<sup>+</sup> incluyó únicamente muestras de tres donantes por grupo de edad. Mientras que la variabilidad interindividual en la densidad de células BCAS1<sup>+</sup> en muestras de cerebro adulto era relativamente pequeña, en los individuos en edad pediátrica dicha variabilidad fue considerable. Posiblemente esta discrepancia se deba a que se analizaron muestras de niños entre 2 y 9 años, una etapa en la que el cerebro humano sufre grandes transformaciones. Es plausible que, de haber incluido un mayor número de muestras en el estudio con estratos de edad más homogéneos y acotados, se hubieran objetivado diferencias en la densidad de células BCAS1<sup>+</sup> relacionadas con la edad. Es, por tanto, conveniente realizar estudios de mayor envergadura que analicen este aspecto. Por otra parte, el proceso de mielinización no es sincrónico en todo el cerebro, ya que los estímulos recibidos y el neurodesarrollo difieren en las diferentes regiones cerebrales (14). Debido a ello, no puede descartarse que existan diferencias regionales en cuanto a la densidad de células BCAS1<sup>+</sup> e incluso que diferentes regiones conserven esta población celular de forma diferencial en la edad adulta. Finalmente, aunque nuestro grupo de donantes adultos no excluía edades extremas, sólo se incluyeron edades adultas intermedias. La inclusión en el estudio de ancianos y la presencia de

células BCAS1<sup>+</sup> en edades avanzadas sustentaría con mayor firmeza el mantenimiento de OPC con capacidad mielinizante a lo largo de toda la vida.

A pesar de que la función de BCAS1 en el SNC es desconocida, se ha descrito que ratones transgénicos *knock out* para BCAS1 (BCAS1<sup>-/-</sup>) muestran hipomielinización y niveles de ansiedad y anomalías conductuales similares a los de modelos de esquizofrenia en ratones (124). Por lo tanto, la persistencia de una población de OL premielinizantes BCAS1<sup>+</sup> a lo largo de la vida es relevante desde el punto de vista de la remodelación de la mielina e incluso en la conservación de la capacidad de aprendizaje tras la infancia (51), pero también para una potencial recuperación funcional tras lesiones que cursen con desmielinización (87). Pese a la imposibilidad de cuantificar células BCAS1<sup>+</sup> en pacientes con esclerosis múltiple en nuestro estudio debido a disponer únicamente de una muestra con esta patología, la observación de células BCAS1<sup>+</sup> en una paciente con varios años de curso de enfermedad arroja esperanzas sobre posibles tratamientos que exploten la capacidad mielinizante de estas células.

Clásicamente, el tratamiento de la EM se ha basado en la inmunosupresión y/o inmunomodulación con el fin de controlar la respuesta inflamatoria (125–128). Es importante destacar que la mielina también se regenera en pacientes con EM durante las etapas tempranas de recaída/remisión, pero a medida que la enfermedad progresa, la remielinización de los axones se vuelve insuficiente y la reparación falla, posiblemente debido al deficiente reclutamiento y diferenciación de OPC en adultos (129). La estimulación de estos procesos ha sido reconocida recientemente como un importante desafío terapéutico para las enfermedades desmielinizantes (130). Es por ello por lo que las técnicas de medicina regenerativa basadas en OPC endógenas, y especialmente aquellas con potencial mielinizante como las células BCAS1<sup>+</sup>, podrían suponer una estrategia prometedora para estimular la formación de OL maduros y reparar la mielina dañada.

### **5.3 Limitaciones del estudio**

Reconocemos la existencia de limitaciones en nuestro estudio que podrían afectar a los resultados y conclusiones obtenidos. El principal problema que encontramos fue la disponibilidad limitada de muestras de tejido cerebral humano, especialmente en el caso de donantes en edad infantil. Asimismo, el hecho de utilizar material humano repercute en la integridad y preservación del tejido, al no poder utilizarse técnicas óptimas de fijación. En el caso particular de las muestras de pacientes de EM, este hecho ha imposibilitado que contemos con un grupo de muestras suficientemente numeroso como para poder llevar a cabo cuantificaciones y análisis estadísticos fiables. Por otra parte, la muestra que obtuvimos procede de una donación *postmortem* a un banco de tejidos, por lo que la preservación del material biológico es especialmente delicada.



En segundo lugar, a pesar de que las muestras de donantes en edad adulta presentaron poca variabilidad interindividual en la densidad de células BCAS1<sup>+</sup>, en el caso de las muestras de donantes en edad pediátrica, esta variabilidad fue más acusada, posiblemente repercutiendo en el análisis estadístico llevado a cabo. Una posible explicación, mencionada en el apartado anterior, sería el rango de edades de las muestras analizadas, el cual incluía muestras de donantes de 2 a 9 años de edad, siendo la infancia una etapa con grandes cambios en el desarrollo neurológico. Con todo, sí que se observa una mayor tendencia a una mayor densidad celular en cerebros adultos. Así pues, planteamos que estudios posteriores deberían realizar una estratificación más exhaustiva.

Por último, las muestras empleadas en nuestro estudio proceden de resecciones realizadas a pacientes con epilepsia refractaria, en la mayoría de casos debida a una displasia cortical focal, una patología relacionada con trastornos de la migración neuronal en la corteza cerebral durante el desarrollo (131). A pesar de que en el estudio se emplearon regiones adyacentes lo más alejadas posible del fondo de surco (normalmente coincidente con el foco epiléptico) y con resultados de imagen (RMN, PET y RM-DTI) normales, ha de tenerse en cuenta que las muestras analizadas proceden de donantes con una patología neurológica. No obstante, estudios anteriores han utilizado muestras del mismo tipo (132).

#### **5.4 Conclusiones**

Hasta la fecha solo existen unos pocos estudios que hayan analizado la población celular BCAS1<sup>+</sup> en el cerebro humano (87,89). Hasta donde sabemos, ninguno de los anteriores estudios había estudiado muestras de donantes en edad pediátrica. Basándonos en la expresión de diversos marcadores moleculares específicos del linaje oligodendroglial y característicos de los distintos estadios celulares madurativos, nuestros resultados sugieren que no existen diferencias relevantes en el proceso madurativo de los OPC entre el cerebro humano en edad infantil y adulta. Asimismo, confirmamos que el marcador BCAS1, expresado por oligodendrocitos inmaduros premielinizantes, se localiza en la membrana plasmática y que la población celular que lo expresa mantiene su densidad celular entre la edad infantil y adulta.

## 6. Bibliografía

1. Del Rio-Hortega P. La microglia y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposos. *Trab Lab Invest Biol Univ Madrid*. 1920;18:37–82.
2. Del Rio-Hortega P. Arte y artificio de la ciencia histológica. *Rev la Resid Estud IV*. 1933;4(6):191–206.
3. Snaidero N, Möbius W, Czopka T, Hekking LHP, Mathisen C, Verkleij D, et al. Myelin membrane wrapping of CNS axons by PI(3,4,5)P3-dependent polarized growth at the inner tongue. *Cell*. 2014;156(1–2):277–90.
4. Stadelmann C, Timmler S, Barrantes-Freer A, Simons M. Myelin in the central nervous system: Structure, function, and pathology. *Physiol Rev*. 2019;99(3):1381–431.
5. Fulton D, Paez PM, Campagnoni AT. The multiple roles of myelin protein genes during the development of the oligodendrocyte. *ASN Neuro*. 2010 Feb;2(1):e00027.
6. Baron W, Hoekstra D. On the biogenesis of myelin membranes: sorting, trafficking and cell polarity. *FEBS Lett*. 2010 May;584(9):1760–70.
7. Fields RD. Myelin formation and remodeling. *Cell*. 2014;156(1–2):15–7.
8. Young, K. M., Psachoulia, K., Tripathi, R. B., Dunn, S. J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., Richardson WD. Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron*. 2013;77(5):873–85.
9. Sampaio-Baptista C, Johansen-Berg H. White Matter Plasticity in the Adult Brain. *Neuron*. 2017;96(6):1239–51.
10. C. Demerens, B. Stankoff, M. Logak, P. Anglade, B. Allinquant, F. Couraud, B. Zalc and CL. Induction of myelination in the central nervous system by electrical activity. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(18):9887–9892.
11. Ishibashi T, Dakin KA, Stevens B, Lee PR, Kozlov S V., Stewart CL, et al. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron*. 2006;49(6):823–32.
12. Arnold DL. Magnetic resonance spectroscopy: imaging axonal damage in MS. *J Neuroimmunol*. 1999 Jul;98(1):2–6.
13. Trapp BD, Bö L, Mörk S, Chang A. Pathogenesis of tissue injury in MS lesions. *J Neuroimmunol*. 1999 Jul;98(1):49–56.
14. Barateiro A, Fernandes A. Temporal oligodendrocyte lineage progression: In vitro models of proliferation, differentiation and myelination. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2014;1843(9):1917–29.
15. Kessar N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD, et al. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci*. 2006;9(2):173–9.
16. Nishiyama A. NG2 cells in the brain: a novel glial cell population. *Hum Cell*. 2001;14(1):77–82.

17. Mary R.L. Dawson, Annabella Polito, Joel M. Levine RR. NG2-expressing glial progenitor cells: an abundant and widespread population of cycling cells in the adult rat CNS. *Mol Cell Neurosci.* 2003;24(2):476–88.
18. Bergles DE, Richardson WD. Oligodendrocyte development and plasticity. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(2):1–27.
19. Greenwood K, Butt AM. Evidence that perinatal and adult NG2-glia are not conventional oligodendrocyte progenitors and do not depend on axons for their survival. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Aug;23(4):544–58.
20. Baumann N, Pham-Dinh D. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 2001 Apr;81(2):871–927.
21. Chen Y, Wu H, Wang S, Koito H, Li J, Ye F, et al. The oligodendrocyte-specific G protein-coupled receptor GPR17 is a cell-intrinsic timer of myelination. *Nat Neurosci.* 2009;12(11):1398–406.
22. Solly SK, Thomas JL, Monge M, Demerens C, Lubetzki C, Gardinier M V, et al. Myelin/oligodendrocyte glycoprotein (MOG) expression is associated with myelin deposition. *Glia.* 1996 Sep;18(1):39–48.
23. Chavali M, Ulloa-Navas MJ, Pérez-Borredá P, Garcia-Verdugo JM, McQuillen PS, Huang EJ, et al. Wnt-Dependent Oligodendroglial-Endothelial Interactions Regulate White Matter Vascularization and Attenuate Injury. *Neuron.* 2020;108(6):1130-1145.e5.
24. Emery B. Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science.* 2010 Nov;330(6005):779–82.
25. Nakatani H, Martin E, Hassani H, Clavairoly A, Maire CL, Viadieu A, et al. *Ascl1/Mash1* promotes brain oligodendrogenesis during myelination and remyelination. *J Neurosci.* 2013;33(23):9752–68.
26. Birey F, Kloc M, Chavali M, Hussein I, Wilson M, Christoffel DJ, Chen T, Frohman MA, Robinson JK, Russo SJ, Maffei A AA. Genetic and Stress-Induced Loss of NG2 Glia Triggers Emergence of Depressive-like Behaviors through Reduced Secretion of FGF2. *Neuron.* 2015;88:941–956.
27. Waly B El, Macchi M, Cayre M, Durbec P. Oligodendrogenesis in the normal and pathological central nervous system. *Front Neurosci.* 2014;8(8 JUN):1–22.
28. Najm FJ, Lager AM, Zaremba A, Wyatt K, Caprariello A V., Factor DC, et al. Transcription factor-mediated reprogramming of fibroblasts to expandable, myelinogenic oligodendrocyte progenitor cells. *Nat Biotechnol.* 2013;31(5):426–33.
29. Harauz G, Ladizhansky V, Boggs JM. Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry.* 2009 Sep;48(34):8094–104.
30. Yin, X., Baek, R. C., Kirschner, D. A., Peterson, A., Fujii, Y., Nave, K. A., Macklin, W. B., & Trapp BD. Evolution of a neuroprotective function of central nervous system myelin. *J Cell Biol.* 2006;172(3):469–478.
31. Dubois-Dalcq M, Behar T, Hudson L, Lazzarini RA. Emergence of three myelin proteins in oligodendrocytes cultured without neurons. *J Cell Biol.* 1986 Feb;102(2):384–92.

32. Amaral AI, Tavares JM, Sonnewald U, Kotter MRN. Oligodendrocytes: Development, Physiology and Glucose Metabolism. *Adv Neurobiol.* 2016;13:275–94.
33. Niu, J., Tsai, H. H., Hoi, K. K., Huang, N., Yu, G., Kim, K., Baranzini, S. E., Xiao, L., Chan, J. R., & Fancy S. Aberrant oligodendroglial-vascular interactions disrupt the Blood Brain Barrier triggering CNS inflammation. *Nat Neurosci.* 2019;22(5):709–718.
34. Tsai HH, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, Tien AC, Kuo CJ, Chan JR, Daneman R FS. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. *Science* (80- ). 2016;351(6271):379–84.
35. He L, Lu QR. Coordinated control of oligodendrocyte development by extrinsic and intrinsic signaling cues. *Neurosci Bull.* 2013 Apr;29(2):129–43.
36. Baerwald, K. D., & Popko B. Developing and mature oligodendrocytes respond differently to the immune cytokine interferon-gamma. *J Neurosci Res.* 1998;52(2):230–9.
37. Gonzalez-Perez O, Romero-Rodriguez R, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):2032–43.
38. Jackson EL, Garcia-Verdugo JM, Gil-Perotin S, Roy M, Quinones-Hinojosa A, Vandenberg S, et al. PDGFR alpha-positive B cells are neural stem cells in the adult SVZ that form glioma-like growths in response to increased PDGF signaling. *Neuron.* 2006 Jul;51(2):187–99.
39. Bonora, M., De Marchi, E., Patergnani, S., Suski, J. M., Celsi, F., Bononi, A., Giorgi, C., Marchi, S., Rimessi, A., Duszyński, J., Pozzan, T., Wieckowski, M. R., & Pinton P. Tumor necrosis factor- $\alpha$  impairs oligodendroglial differentiation through a mitochondria-dependent process. *Cell Death Differ.* 2014;21(8):1198–208.
40. Bergles DE, Roberts JD, Somogyi P JC. Glutamatergic synapses on oligodendrocyte precursor cells in the hippocampus. *Nature.* 2000;405(6783):187–91.
41. Harsan LA, Steibel J, Zaremba A, Agin A, Sapin R, Poulet P, et al. Recovery from chronic demyelination by thyroid hormone therapy: Myelinogenesis induction and assessment by diffusion tensor magnetic resonance imaging. *J Neurosci.* 2008;28(52):14189–201.
42. Mason JL, Ye P, Suzuki K, D’Ercole AJ, Matsushima GK. Insulin-like growth factor-1 inhibits mature oligodendrocyte apoptosis during primary demyelination. *J Neurosci.* 2000;20(15):5703–8.
43. Mason JL, Xuan S, Dragatsis I, Efstratiadis A, Goldman JE. Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *J Neurosci.* 2003;23(20):7710–8.
44. Huang JK, Franklin RJM. Regenerative medicine in multiple sclerosis: identifying pharmacological targets of adult neural stem cell differentiation. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):329–32.
45. Ortega, F., Gascón, S., Masserdotti, G., Deshpande, A., Simon, C., Fischer, J., Dimou, L., Chichung Lie, D., Schroeder, T., & Berninger B. Oligodendroglial and neurogenic adult subependymal zone neural stem cells constitute distinct lineages and exhibit

- differential responsiveness to Wnt signalling. *Nat Cell Biol.* 2013;15(6):602–13.
46. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004 Mar;116(6):769–78.
  47. Pruvost M, Moyon S. Oligodendroglial Epigenetics , from Lineage Specification to Activity-Dependent Myelination. *Life.* 2021;11(62):1–34.
  48. Yu Y, Casaccia P, Lu QR. Shaping the oligodendrocyte identity by epigenetic control. *Epigenetics.* 2010 Feb;5(2):124–8.
  49. Liu J, Casaccia P. Epigenetic regulation of oligodendrocyte identity. *Trends Neurosci.* 2010;33(4):193–201.
  50. Tiane A, Schepers M, Rombaut B, Hupperts R, Prickaerts J, Hellings N, et al. From OPC to Oligodendrocyte: An Epigenetic Journey. *Cells.* 2019;8(10):1–19.
  51. McKenzie IA, Ohayon D, Li H, De Faria JP, Emery B, Tohyama K, et al. Motor skill learning requires active central myelination. *Science (80- ).* 2014;346(6207):318–22.
  52. Bengtsson SL, Nagy Z, Skare S, Forsman L, Forssberg H, Ullén F. Extensive piano practicing has regionally specific effects on white matter development. *Nat Neurosci.* 2005;8(9):1148–50.
  53. Bacmeister CM, Barr HJ, McClain CR, Thornton MA, Nettles D, Welle CG, et al. Motor learning promotes remyelination via new and surviving oligodendrocytes. *Nat Neurosci.* 2020;23(7):819–31.
  54. Jensen SK, Michaels NJ, Ilyntskyy S, Keough MB, Kovalchuk O, Yong VW. Multimodal Enhancement of Remyelination by Exercise with a Pivotal Role for Oligodendroglial PGC1 $\alpha$ . *Cell Rep.* 2018;24(12):3167–79.
  55. Kessaris N, Fogarty M, Iannarelli P, Grist M, Wegner M, Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci.* 2006;9(2):173–9.
  56. Orentas, D. M., Hayes, J. E., Dyer, K. L., & Miller RH. Sonic hedgehog signaling is required during the appearance of spinal cord oligodendrocyte precursors. *Dev.* 1999;126(11):2419–29.
  57. Nery, S., Wichterle, H., & Fishell G. Sonic hedgehog contributes to oligodendrocyte specification in the mammalian forebrain. *Dev (Cambridge)*2. 2001;128(4):527–40.
  58. Kessaris, N., Fogarty, M., Iannarelli, P., Grist, M., Wegner, M., & Richardson WD. Competing waves of oligodendrocytes in the forebrain and postnatal elimination of an embryonic lineage. *Nat Neurosci.* 2006;9(2):173–179.
  59. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Soriano-Navarro M, Gonzalez-Perez O, Mirzadeh Z, Gil-Perotin S, et al. Cellular composition and cytoarchitecture of the adult human subventricular zone: a niche of neural stem cells. *J Comp Neurol.* 2006;494(3):415–34.
  60. Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature.* 2010;468(7321):214–22.

61. Richardson WD, Kessaris N, Pringle N. Oligodendrocyte wars. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):11–8.
62. Dean JM, Moravec MD, Grafe M, Abend N, Ren J, Gong X, et al. Strain-specific differences in perinatal rodent oligodendrocyte lineage progression and its correlation with human. *Dev Neurosci.* 2011;33(3–4):251–60.
63. Tekki-Kessaris N, Woodruff R, Hall AC, Gaffield W, Kimura S, Stiles CD, et al. Hedgehog-dependent oligodendrocyte lineage specification in the telencephalon. *Development.* 2001 Jul;128(13):2545–54.
64. Newville J, Jantzie LL, Cunningham LA. Embracing oligodendrocyte diversity in the context of perinatal injury. *Neural Regen Res.* 2017;12(10):1575–85.
65. Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S, & Zecevic N, Jakovcevski I, Filipovic R, Mo Z, Rakic S ZN. Oligodendrocyte development and the onset of myelination in the human fetal brain. *Front Neuroanat.* 2009;3(5).
66. Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Levine JM, Volpe JJ KH. Late Oligodendrocyte Progenitors Coincide with the Developmental Window of Vulnerability for Human Perinatal White Matter Injury. *J Neurosci.* 2001;21(4):1302–1312.
67. Dr Petra S. Hüppi MD Simon Warfield PhD Ron Kikinis MD Patrick D. Barnes MD Gary P. Zientara PhD Ferenc A. Jolesz MD Miles K. Tsuji MD Joseph J. Volpe MD. Quantitative magnetic resonance imaging of brain development in premature and mature newborns. *Ann Neurol.* 2004;43(2):224–35.
68. Dimou, L., Simon, C., Kirchhoff, F., Takebayashi, H., & Götz M. Articles, Development/Plasticity/Repair Progeny of Olig2-Expressing Progenitors in the Gray and White Matter of the Adult Mouse Cerebral Cortex. *J Neurosci.* 2008;28(41):10434–42.
69. Capilla-Gonzalez V, Cebrian-Silla A, Guerrero-Cazares H, Garcia-Verdugo JM, Quiñones-Hinojosa A. The generation of oligodendroglial cells is preserved in the rostral migratory stream during aging. *Front Cell Neurosci.* 2013;7(SEP):1–9.
70. Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev.* 2011;67(1–2):147–56.
71. Menn, B., Garcia-Verdugo, J. M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., & Alvarez-Buylla A, Menn B, Garcia-Verdugo JM, Yaschine C, Gonzalez-Perez O, Rowitch D, et al. Origin of Oligodendrocytes in the Subventricular Zone of the Adult Brain. *J Neurosci.* 2006;26(30):7907–7918.
72. Altman J. Are New Neurons Formed in the. *Science* (80- ). 1962;135(January):0–1.
73. Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol.* 1965;124(3):319–35.
74. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969;137(4):433–57.
75. Obernier K, Alvarez-Buylla A. Neural stem cells: Origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Dev.* 2019;146(4).

76. Sanai N, Tramontin AD, Quiñones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, et al. Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*. 2004;427(6976):740–4.
77. Spassky N, Merkle FT, Flames N, Tramontin AD, Garcia-Verdugo JM, Álvarez-Buylla A. Adult ependymal cells are postmitotic and are derived from radial glial cells during embryogenesis. *J Neurosci*. 2005;25(1):10–8.
78. Doetsch F, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci*. 1997;17(13):5046–61.
79. Sawamoto K, Wichterle H, Gonzalez-Perez O, Cholfin JA, Yamada M, Spassky N, et al. New neurons follow the flow of cerebrospinal fluid in the adult brain. *Science*. 2006 Feb;311(5761):629–32.
80. Obernier K, Cebrian-Silla A, Thomson M, Parraguez JI, Anderson R, Guinto C, et al. Adult Neurogenesis Is Sustained by Symmetric Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell*. 2018;22(2).
81. Sanai N, Nguyen T, Ihrie RA, Mirzadeh Z, Tsai H-H, Wong M, et al. Corridors of migrating neurons in the human brain and their decline during infancy. *Nature*. 2011 Sep;478(7369):382–6.
82. Quiñones-Hinojosa A, Sanai N, Gonzalez-Perez O, Garcia-Verdugo JM. The human brain subventricular zone: stem cells in this niche and its organization. *Neurosurg Clin N Am*. 2007;18(1):15-20–vii.
83. Dilek Colak I, Tetsuji Mori, Monika S Brill, Alexander Pfeifer, Sven Falk, Chuxia Deng, Rui Monteiro, Christine Mummery, Lukas Sommer MG. Adult neurogenesis requires Smad4-mediated bone morphogenic protein signaling in stem cells. *J Neurosci*. 2009;28(2):434 – 445.
84. Tong CK, Fuentealba LC, Shah JK, Lindquist RA, Ihrie RA, Guinto CD, et al. A Dorsal SHH-Dependent Domain in the V-SVZ Produces Large Numbers of Oligodendroglial Lineage Cells in the Postnatal Brain. *Stem cell reports*. 2015;5(4):461–70.
85. Collins C, Rommens JM, Kowbel D, Godfrey T, Tanner M, Hwang SI, Polikoff D, Nonet G, Cochran J, Myambo K, Jay KE, Froula J, Cloutier T, Kuo WL, Yaswen P, Dairkee S, Giovanola J, Hutchinson GB, Isola J, Kallioniemi OP, Palazzolo M, Martin C, Ericsson C, Pi GJ. Positional cloning of ZNF217 and NABC1: genes amplified at 20q13.2 and overexpressed in breast carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*. 1998;95(15):8703–8.
86. Zhang, Y., Chen, K., Sloan, S. A., Bennett, M. L., Scholze, A. R., O’Keefe, S., Phatnani, H. P., Guarnieri, P., Caneda, C., Ruderisch, N., Deng, S., Liddelow, S. A., Zhang, C., Daneman, R., Maniatis, T., Barres, B. A., & Wu JQ. An RNA-Sequencing Transcriptome and Splicing Database of Glia, Neurons, and Vascular Cells of the Cerebral Cortex. *J Neurosci*. 2014;34(36):11929–11947.
87. Fard MK, van der Meer F, Sánchez P, Cantuti-Castelvetri L, Mandad S, Jäkel S, et al. BCAS1 expression defines a population of early myelinating oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Sci Transl Med*. 2017 Dec 6;9(419):eaam7816.
88. Ninomiya K, Ishimoto T, Taguchi T. Subcellular Localization of PMES-2 Proteins

- Regulated by Their two Cytoskeleton-Associated Domains. *Cell Mol Neurobiol*. 2005;25(5):899–911.
89. Kaji S, Maki T, Ueda J, Ishimoto T, Inoue Y, Yasuda K, et al. BCAS1-positive immature oligodendrocytes are affected by the  $\alpha$ -synuclein-induced pathology of multiple system atrophy. *Acta Neuropathol Commun*. 2020;8(1):1–13.
  90. Maggie S.Y. Yeung, Sofia Zdunek, Olaf Bergmann, Samuel Bernard, Mehran Salehpour, Kanar Alkass, Shira Perl, John Tisdale, Göran Possnert, Lou Brundin, Henrik Druid JF, Yeung MSY, Zdunek S, Bergmann O, Bernard S, Salehpour M, et al. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*. 2014;159(4):766–74.
  91. Dobson R, Giovannoni G. Multiple sclerosis – a review. *Eur J Neurol*. 2019;26(1):27–40.
  92. Compston, A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2005;372(9648):1502–17.
  93. Koch-Henriksen, N., & Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. *Lancet*. 2010;9(5):520–32.
  94. Rasmussen HB, Clausen J. Genetic risk factors in multiple sclerosis and approaches to their identification. *J Neurovirol*. 2000 May;6 Suppl 2:S23-7.
  95. Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, et al. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet*. 2005 Sep;77(3):454–67.
  96. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dyment DA, Tiislar M, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2005 Oct;37(10):1108–12.
  97. Almohmeed, Y. H., Avenell, A., Aucott, L., & Vickers MA. Systematic review and meta-analysis of the sero-epidemiological association between Epstein Barr virus and multiple sclerosis. *PLoS One*. 2013;8(4):61110.
  98. Gustavsen MW, Page CM, Moen SM, Bjølgerud A, Berg-Hansen P, Nygaard GO, et al. Environmental exposures and the risk of multiple sclerosis investigated in a Norwegian case-control study. *BMC Neurol*. 2014 Oct;14:196.
  99. Maghzi AH, Etemadifar M, Heshmat-Ghahdarijani K, Moradi V, Nonahal S, Ghorbani A, et al. Cigarette smoking and the risk of multiple sclerosis: A sibling case-control study in Isfahan, Iran. *Neuroepidemiology*. 2011;37(3–4):238–42.
  100. Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Hupperts R. Vitamin D as an immune modulator in multiple sclerosis, a review. *J Neuroimmunol*. 2008 Feb;194(1–2):7–17.
  101. Orton S-M, Morris AP, Herrera BM, Ramagopalan S V, Lincoln MR, Chao MJ, et al. Evidence for genetic regulation of vitamin D status in twins with multiple sclerosis. *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88(2):441–7.
  102. Amezcua L, Chung RH, Conti D V, Langer-Gould AM. Vitamin D levels in Hispanics with multiple sclerosis. *J Neurol*. 2012 Dec;259(12):2565–70.
  103. Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C. Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain*. 2010 Jul;133(Pt 7):1869–88.



104. Liu Z, Zhang TT, Yu J, Liu YL, Qi SF, Zhao JJ, et al. Excess Body Weight during Childhood and Adolescence Is Associated with the Risk of Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis. *Neuroepidemiology*. 2016;47(2):103–8.
105. Amato, M. P., Derfuss, T., Hemmer, B., Liblau, R., Montalban, X. SS. Environmental modifiable risk factors for multiple sclerosis: Report from the 2016 ECTRIMS focused workshop. *Mult Scler*. 2018;24(5):590–603.
106. McFarland, H. F., & Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*. 2007;8(9):913–9.
107. Lublin, F. D, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996;46(4):907–911.
108. Confavreux, C., Aimard, G., Devic M. Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*. 1980;103(2):281–300.
109. Weinshenker, B. G., Bass, B., Rice, G. P., Noseworthy, J., Carriere, W., Baskerville, J., Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain*. 1989;112(1):133–46.
110. Compston, A., Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372(9648):1502–17.
111. Huss, A. M., Halbgebauer, S., Öckl, P., Trebst, C., Spreer, A., Borisow N. Importance of cerebrospinal fluid analysis in the era of McDonald 2010 criteria: a German–Austrian retrospective multicenter study in patients with a clinically isolated syndrome. *J Neurol*. 2016;263(12):2499–504.
112. Confavreux, C., Vukusic, S., Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*. 2003;126(4):770–82.
113. Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis-the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med*. 2006 Mar;354(9):942–55.
114. Raine CS. Multiple sclerosis: immune system molecule expression in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1994 Jul;53(4):328–37.
115. Ludwin SK. The pathogenesis of multiple sclerosis: relating human pathology to experimental studies. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2006 Apr;65(4):305–18.
116. Kuhle, J., Disanto, G., Dobson, R., Adutori, R., Bianchi, L., Topping, J., Bestwick, J. P., Meier, U. C., Marta, M., Dalla Costa, G., Runia, T., Evdoshenko, E., Lazareva, N., Thouvenot, E., Iaffaldano, P., Drenzo, V., Khademi, M., Piehl, F., Comabella, M. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: a large multicentre study. *Mult Scler*. 2015;21(8):1013–24.
117. Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;133(1):13–24.
118. Prineas, J. W., Barnard, R. O., Kwon, E. E., Sharer, L. R., Cho ES. Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. 1993;33(2):137–51.

119. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C LH. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain*. 2006;129(12):3165–72.
120. Fard MK, Van der Meer F, Sánchez P, Cantuti-Castelvetri L, Mandad S, Jäkel S, et al. BCAS1 expression defines a population of early myelinating oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. *Sci Transl Med*. 2017 Dec 6;9(419):eaam7816.
121. Peters A, Palay SL, Webster H. The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. 1st ed. Peters A, editor. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company; 1976.
122. Lim, D. A., Huang, Y. C., & Alvarez-Buylla A. The adult neural stem cell niche: lessons for future neural cell replacement strategies. *Neurosurg Clin N Am*. 2007;18(1):81–92.
123. Zhu X, Hill RA, Dietrich D, Komitova M, Suzuki R, Nishiyama A. Age-dependent fate and lineage restriction of single NG2 cells. *Development*. 2011 Feb;138(4):745–53.
124. Ishimoto, T., Ninomiya, K., Inoue, R., Koike, M., Uchiyama, Y., Mori H, Ishimoto T, Ninomiya K, Inoue R, Koike M, Uchiyama Y, et al. Mice lacking BCAS1, a novel myelin-associated protein, display hypomyelination, schizophrenia-like abnormal behaviors, and upregulation of inflammatory genes in the brain. *Glia*. 2017;65(5):727–39.
125. Anis S, Achiron A. [Emerging new therapies for relapsing remitting multiple sclerosis]. *Harefuah*. 2014 Nov;153(11):658-662,686,687.
126. Finkelsztejn A. Multiple sclerosis: overview of disease-modifying agents. *Perspect Medicin Chem*. 2014;6:65–72.
127. di Nuzzo L, Orlando R, Nasca C, Nicoletti F. Molecular pharmacodynamics of new oral drugs used in the treatment of multiple sclerosis. *Drug Des Devel Ther*. 2014 May 19;8:555–68.
128. Du Pasquier RA, Pinschewer DD, Merkler D. Immunological mechanism of action and clinical profile of disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2014 Jun;28(6):535–58.
129. Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Brück W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain*. 2008 Jul;131(Pt 7):1749–58.
130. Franklin RJM, Ffrench-Constant C, Franklin R.J. F-CC. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nat Rev Neurosci*. 2008 Nov;9(11):839–55.
131. Tahta A, Turgut M. Focal cortical dysplasia: etiology, epileptogenesis, classification, clinical presentation, imaging, and management. *Child's Nerv Syst*. 2020;36(12):2939–47.
132. Sorrells SF, Paredes MF, Cebrian-Silla A, Sandoval K, Qi D, Kelley KW, et al. Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature*. 2018;555(7696):377–81.