

ORIGINAL

Coexpresión de NG2/GFAP tras la diferenciación en células transfectadas con las mutaciones de GFAP y en células procedentes de gliomas indiferenciados



U. Gómez-Pinedo^{a,*}, S. Sirerol-Piquer^b, M. Durán-Moreno^b, J.A. Matias-Guiu^a, J.A. Barcia^a, J.M. García-Verdugo^b y J. Matias-Guiu^a

^a Laboratorio de Neurobiología, Instituto de Neurociencias, IdISSC, Hospital Clínico San Carlos, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España

^b Laboratorio de Neurobiología Comparada, Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva, Universidad de Valencia, Valencia, España

Recibido el 19 de octubre de 2017; aceptado el 5 de noviembre de 2017

PALABRAS CLAVE

NG2;
GFAP;
Glioma;
Caspasa 3;
Enfermedad de Alexander ;

Resumen

Introducción: La enfermedad de Alexander es una enfermedad rara causada por mutaciones en el gen que codifica la proteína glial ácida fibrilar (GFAP). En un estudio previo hemos observado que la diferenciación de neuroesferas transfectadas con estas mutaciones genera un tipo celular que comparte la expresión de GFAP y NG2.

Objetivos: Determinar el efecto de las mutaciones en marcadores moleculares en comparación con células de glioma diferenciados que expresan simultáneamente GFAP y NG2.

Métodos: Se utilizaron muestras de glioblastoma humana (GLM) y neuroesferas procedentes de rata transfectadas con mutaciones de GFAP para el análisis de la expresión tras diferenciación de GFAP y NG2, así como el análisis inmunocitoquímico de diferenciación de ambos tipos celulares y detección de ambas proteínas, junto a nestina, vimentina, Olig2 y caspasa 3 a los 3 y 7 días de diferenciación.

Resultados: Tanto las células transfectadas con mutaciones de GFAP como las células procedentes de GLM mostraron un incremento de NG2 y GFAP. Sin embargo, la expresión de células caspasa 3 positiva era marcadamente mayor entre las células transfectadas que entre las células procedentes de GLM.

Conclusión: Nuestros resultados parecen indicar que la expresión de GFAP no es el único factor que condiciona la muerte celular en la enfermedad de Alexander y que la expresión de caspasa 3 y el potencial papel de la NG2 en incrementar la resistencia a la apoptosis en las células que coexpresan GFAP y NG2 deben ser considerados en la búsqueda de acciones terapéuticas en esta enfermedad.

© 2017 Sociedad Española de Neurología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: ulisesalfonso.gomez@salud.madrid.org (U. Gómez-Pinedo).

KEYWORDS

NG2;
GFAP;
Glioma;
Caspase-3;
Alexander disease

NG2 and GFAP co-expression after differentiation in cells transfected with mutant GFAP and in undifferentiated glioma cells

Abstract

Introduction: Alexander disease is a rare disorder caused by mutations in the gene coding for glial fibrillary acidic protein (GFAP). In a previous study, differentiation of neurospheres transfected with these mutations resulted in a cell type that expresses both GFAP and NG2.

Objective: To determine the effect of molecular marker mutations in comparison to undifferentiated glioma cells simultaneously expressing GFAP and NG2.

Methods: We used samples of human glioblastoma (GBM) and rat neurospheres transfected with GFAP mutations to analyse GFAP and NG2 expression after differentiation. We also performed an immunocytochemical analysis of neuronal differentiation for both cell types and detection of GFAP, NG2, vimentin, Olig2, and caspase-3 at 3 and 7 days from differentiation.

Results: Both the cells transfected with GFAP mutations and GBM cells showed increased NG2 and GFAP expression. However, expression of caspase-3—positive cells was found to be considerably higher in transfected cells than in GBM cells.

Conclusions: Our results suggest that GFAP expression is not the only factor associated with cell death in Alexander disease. Caspase-3 expression and the potential role of NG2 in increasing resistance to apoptosis in cells co-expressing GFAP and NG2 should be considered in the search for new therapeutic strategies for the disease.

© 2017 Sociedad Española de Neurología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La base patológica de la enfermedad de Alexander (AxD) es la aparición de los cuerpos de Rosenthal¹, unas inclusiones citoplasmáticas, que también han sido descritas en otras enfermedades. Estas inclusiones están constituidas por proteína glial ácida fibrilar (GFAP). El origen de la enfermedad se ha relacionado con la presencia de mutaciones en el gen que codifica la GFAP, pero todavía no se conoce a través de qué mecanismo^{2,3}, aunque se ha defendido la hipótesis de que las mutaciones de GFAP pueden conducir al acúmulo de GFAP y la elevación de la proteína sea dañina para la célula, no solo porque pueda ser estructuralmente anómala sino por un mecanismo de ganancia de función⁴ y agregación⁵. A pesar de ello, se han planteado otras hipótesis que pueden contribuir a desarrollar la enfermedad^{6–8}. En un estudio previo, hemos indicado que las mutaciones de la GFAP podrían suponer la persistencia de esta proteína durante la diferenciación a la estirpe oligodendrocitaria, generando un tipo celular con la expresión persistente y conjunta de GFAP y NG2 que no conduciría a la generación de precursores oligodendrocitarios⁹ y que podría explicar las alteraciones de la mielina que se presentan en la mayoría de los pacientes. La glía NG2 es una población celular que coexpresa GFAP y NG2 y estas células pueden migrar al cuerpo calloso donde se convierten en progenitores oligodendrogiales. Al margen de ello, la expresión de estas proteínas supone poblaciones celulares excluyentes^{10,11}. Sin embargo, la coexpresión de GFAP y NG2 está también descrita en las células de algunos gliomas (GLM), tanto en el propio tumor^{12,13} como en el tejido alrededor del mismo¹⁴. Estos gliomas que expresan NG2 pueden proceder de las llamadas células madre tumorales, que son indiferenciadas¹⁵, aunque hay distintos

tipos de glioma que lo presentan. La expresión de NG2 en estos gliomas parece promover la quimiorresistencia y proteger contra la muerte celular y también puede fomentar la invasión tumoral ya que NG2 promueve la migración¹⁶. El aumento de la resistencia de las células de glioma que expresan NG2 a la quimioterapia y radioterapia se ha atribuido a la interacción cis de NG2 con $\alpha 3 \beta 1$ -integrina que activa la vía de señal PI3K/Akt¹⁷. Los GLM pueden expresar GFAP y desarrollar fibras de Rosenthal de forma similar a la AxD¹⁸, pero no generan alteraciones de la mielina, de forma que puede ser interesante comparar en que se diferencia entre ambas situaciones en cuanto existe la coexpresión de NG2. Con este objetivo, hemos analizado la diferenciación de células indiferenciadas procedentes de GLM con neuroesferas a las que se han transfectado las mutaciones de GFAP con el objetivo de evaluar las diferencias en los tipos celulares resultantes.

Métodos

Obtención de las células procedentes de GLM

Previo consentimiento informado, las muestras fueron recolectadas mediante abordaje estereotáctico y recolectadas en Dulbecco's Modified Eagle Medium hasta su disgregación y cultivo en Dulbecco's Modified Eagle Medium bajo en glucosa y suplementado con L-glutamina (2 mM), aminoácidos no esenciales (1%), suero fetal bovino (10%), penicilina (1.00 U/ml) y estreptomycin (0,1 μ g/ml) en una atmósfera húmeda a 37 °C y 5% de CO₂. Todos los medios de cultivo y suplementos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Para su diferenciación, en pase 8, las células fueron disgrega-

das y cultivadas en chambers slides pretratadas (Fisher) de 4 pocillos y sembradas a una concentración de 25×10^3 células; posterior a esto, al día 3 y 7 se procedió a su fijación en PFA 4% para su ulterior análisis por técnicas de inmunocitoquímica.

Obtención de los plásmidos de las mutaciones de GFAP

Para la realización de los experimentos se obtuvieron los plásmidos de las mutaciones más frecuentes de GFAP. A través del Dr. Michael Brenner (NINDS, NIH, Maryland, EE. UU.), se obtuvieron las construcciones de hGFAPR79H, hGFAPR239H y hGFAPR416W. La construcción de hGFAPR88C se obtuvo en el laboratorio mediante mutagénesis dirigida. Se transfectaron neuroesferas con hGFAPwt (WT), hGFAPR88C, hGFAPR79H, hGFAPR239H y hGFAPR416W mediante Pfu Turbopolimerasa (Stratagene). Las neuroesferas se transfectaron 5 días *in vitro* (DIV) después del paso 6-7 por medio de la tecnología de nucleofección (Amaxa Nucleofector II, Lonza), usando el programa A-33. Cada matraz de 75 cm² se transfectó usando 4 µg de ADN plasmático y se cultivó con medio completo. Con el fin de estimar la eficiencia de la transfección se utilizó el plásmido pMAX-GFP suministrado en el kit Amaxa Nucleofector® de células madre neuronales de ratón (Lonza). El método completo de realización a las neuroesferas ha sido descrito previamente⁹.

Diferenciación

Transcurridas 72 h de recuperación en medio completo, las neuroesferas se sembraron en medio de diferenciación compuesto por medio control suplementado con 1,5% de suero fetal bovino (Gibco; Ref. 16000). Para ello, las neuroesferas procedentes de un pocillo de 9 cm² se sembraron en 3 pocillos de 2 cm² que contenían un cubreobjetos tratado previamente con poly-D-lisina (Sigma; Ref P1024). Para cada transfección se obtuvieron un total de 6 pocillos de 2 cm². Antes de cada siembra en el medio de diferenciación se realizaron 2 lavados para eliminar los restos de factores de crecimiento del medio completo. Para el análisis de la diferenciación se establecieron 2 puntos temporales de análisis: 3 y 7 días dedicando 3 pocillos de 2 cm² para cada tiempo. Las inmunocitoquímicas de realizaron sobre las neuroesferas adheridas a los cubreobjetos.

Inmunocitoquímica

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-hGFAP de ratón (1: 500, Sternberger Monoclonal), chicken anti-Vimentin (1:200, Millipore), rabbit anti-NG2 (1:200, Millipore), mouse anti-Olig2 (1:200, Millipore), mouse anti-Nestin (1:200, Millipore), rabbit anti-active caspase-3 (1:200, Abcam). Los anticuerpos secundarios correspondientes se incubaron durante 2 h (Alexa-Fluor 405, 488, 555 o 647 de cabra anti-ratón, pollo o conejo, 1: 500, Invitrogen), seguido de incubación con DAPI (1: 1000, Sigma) durante 10 min y enjuagado antes de ser montado en portaobjetos de vidrio con FluorSave (Calbiochem). Los análisis se reali-

zaron con un microscopio de fluorescencia Nikon 80i con una ampliación de 40x o 63x.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, las muestras fueron procesadas por triplicado y de 2 experimentos independientes se contaron para cada condición utilizando el microscopio Nikon 80i con ampliaciones de 40 o 63x. Se contaron un mínimo de 150 células transfectadas por cubreobjetos, los resultados de las transfecciones se utilizaron como dato único vs. los datos observados en las células GLM. En los cultivos de GLM, se analizaron al menos 300 células por condición y experimento. Todos los valores se presentan como media $\pm$ error estándar.

Resultados

La expresión de GFAP está aumentada en las células GLM previamente a la diferenciación con una media de 0,339 OD, con un rango 0,333-0,342 frente a WT (0,272; rango 0,256-0,287). Al proceder al proceso de diferenciación, la expresión aumenta de forma clara. Así, al tercer día de diferenciación estas células muestran una expresión de GFAP 0,664 OD (0,632-0,691) y al séptimo día, la expresión era de 0,865 OD (0,822-0,918). Si se compara con la expresión que muestran las células AxD, se observa que la expresión de GFAP es similar. La expresión de GFAP a los 3 días de diferenciación fue 0,648 OD (0,578-0,705) mientras que a los 7 días fue 0,820 OD (0,797-0,834), sin diferencias significativas (fig. 1A). La expresión de GFAP se observa aumentada tanto en las células AxD como GLM durante la diferenciación frente a WT en los 3 días (0,357 OD; 0,315-0,391) como a los 7 días (0,511 OD; 0,491-0,521). Asimismo, se ha observado diferencias en la expresión de NG2 en GLM previamente a la diferenciación frente a WT (0,339 OD, rango 0,333-0,345; 0,184 OD, rango 0,178-0,189 respectivamente). Al proceder al mismo proceso de diferenciación, la expresión aumenta (0,411 OD; 0,388-0,435) frente a WT (0,271 OD; 0,225-0,282), pero existe un incremento mayor en la expresión de NG2 frente a GLM y a WT en las células transfectadas (0,772 OD; 0,625-0,868). Asimismo, estas diferencias se observan al séptimo día de diferenciación, ya que, aunque la expresión de NG2 en GLM (0,423 OD; 0,401-0,467) es discretamente mayor a la que se halla en WT (0,201 OD; 0,125-0,229), parece menor a la encontrada en las células transfectadas (0,807 OD; 0,745-0,888) (fig. 1B).

La comparación entre GFAP y NG2 aparece en la figura 1, donde la expresión de NG2 se observa en forma de grupos y con una mayor densidad de marcaje; cabe señalar que la expresión de NG2 se observa en conjunto de células agrupadas en neuroesferas de forma atípica, ya que no mantienen una estructura esférica y uniforme como la observada en el grupo WT, en cambio en las células de GLM la expresión de NG2 se observa en células individuales o agrupadas en pequeños conjuntos con una forma estrellada o fusiforme donde la mayor densidad de marcaje se observa en los brazos apicales y en pequeñas zonas perinucleares (fig. 1C). La expresión de GFAP se observa de forma similar en las neuroesferas transfectadas, así como en las células GLM,

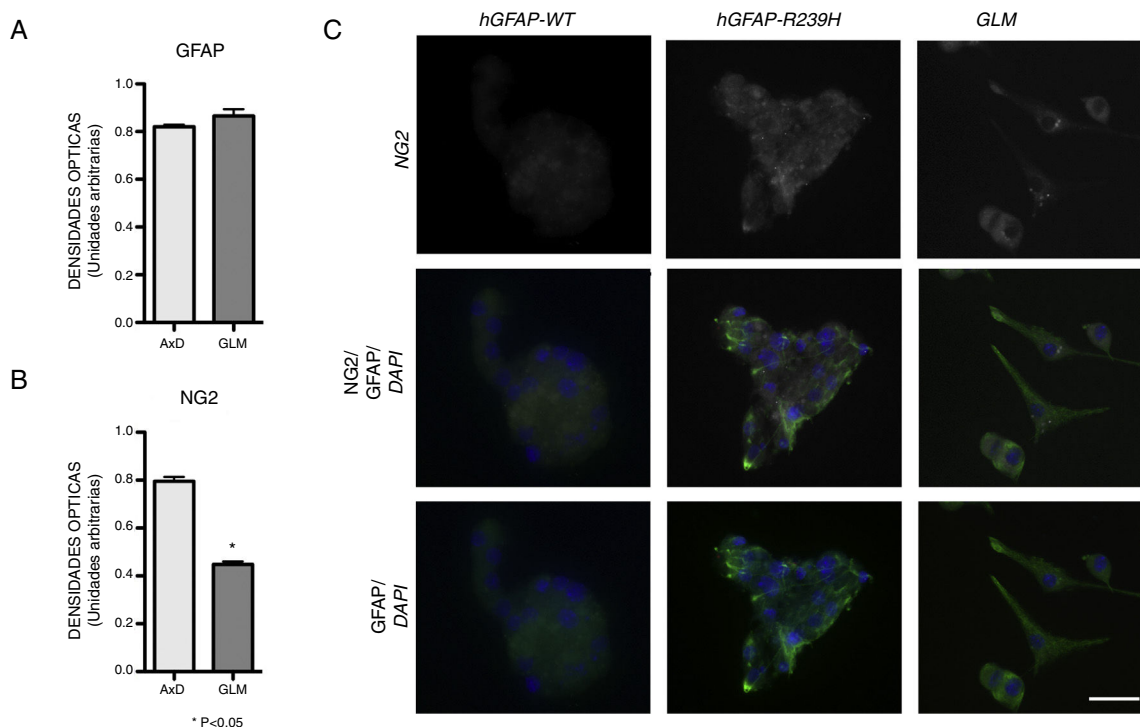


Figura 1 Expresión de GFAP y NG2. A-B) Cuantificación de la expresión de GFAP y NG2 a 7 días de diferenciación C) se muestran imágenes de inmunofluorescencia de las muestras WT, AxD y GLM, donde se observan los patrones diferentes de expresión y de tipos de agrupación de las células. Es evidente que en las neuroesferas AxD se observa un mayor grado de agregados de filamentos GFAP positivos y marcaje NG2 atípico en la membrana celular. En las células de GLM el marcaje de la NG2 se observa en la membrana celular y en pequeños agregados perinucleares. La GFAP se observa en estas células en su citoesqueleto y en sus filopodios en su porción apical, donde el marcaje es más intenso.

Barra = 25 μ m. Los gráficos muestran la media + error estándar, *p < 0,05.

manteniendo una mayor expresión de marcaje en las zonas o áreas donde hay expresión de NG2.

En el proceso de diferenciación no se observan diferencias en la expresión de nestina entre las células transfectadas (0,636 OD; 0,429-0,764) y GLM (0,569 OD; 0,490-0,670) al tercer día (fig. 2A). Al día 7, tampoco se hallan entre GLM (0,691 OD; 0,589-0,865) a la hallada en las células transfectadas (0,555 OD; 0,408-0,671) (fig. 2A). Sin embargo, en GLM existe una tendencia ascendente de nestina con la diferenciación, en AxD la tendencia parece ser inversa. Con relación a la expresión de vimentina(VIM) no existen diferencias entre las células transfectadas (0,676 OD; 0,494-0,870) y GLM (0,596 OD; 0,521-0,665) al tercer día. Tampoco se hallan entre GLM (0,463 OD; 0,412-0,513) a la hallada en las células transfectadas (0,590 OD; 0,310-0,847) al séptimo día, con una tendencia a disminuir en ambos tipos celulares (fig. 2B). El % de células que coexpresan VIM y NG2 era algo mayor en AxD que en GLM durante el proceso de diferenciación ya que al tercer día el 25,5% de las células eran VIM+ NG2+ en AxD frente al 16% en GLM mientras que el 37,5 y 33% eran VIM+ NG2- en AxD y GLM respectivamente. Al séptimo día el 24% de las células eran VIM+ NG2+ en AxD frente al 19% en GLM mientras que el 37,75 y 31% eran VIM+ NG2- en AxD y GLM respectivamente. Respecto a la OLIG2+, que implica la diferenciación de las células NG2, al tercer día el 15,1% de las células eran OLIG2+ en AxD frente al 13,2% en GLM mientras que al séptimo día

el 16,9% de las células eran OLIG2+ en AxD frente al 8% en GLM.

Hemos comparado también la expresión de caspasa 3 (Cas3) en los 3 grupos celulares. Así, el 57% de las células de AxD eran Cas+, mientras que el GLM solo lo era el 33,5% en el tercer día, incrementándose ese porcentaje en el séptimo día (AxD 67,75%; GLM 39,25%) (fig. 3).

Discusión

Las proteínas GFAP y NG2 no comparten el mismo tipo celular en las células adultas^{19,20}, salvo en algunas poblaciones celulares embrionarias y adultas²¹⁻²³. Transfectando los plásmidos de mutaciones de GFAP relacionadas con la AxD a neuroesferas y estableciendo un proceso de diferenciación, observamos un tipo celular que compartía la expresión de ambas proteínas, lo que ha conducido a postular que el mecanismo de desarrollo de esta enfermedad puede estar relacionado con alteraciones en la diferenciación. Para aumentar el conocimiento de lo que supone la coexpresión de GFAP y NG2, hemos comparado distintos marcadores en las células transfectadas con mutaciones de AxD frente a un tipo celular que las comparte como son algún tipo celular de GLM. Así, células en las que se había comprobado que expresaban GFAP y NG2 simultáneamente, procedentes

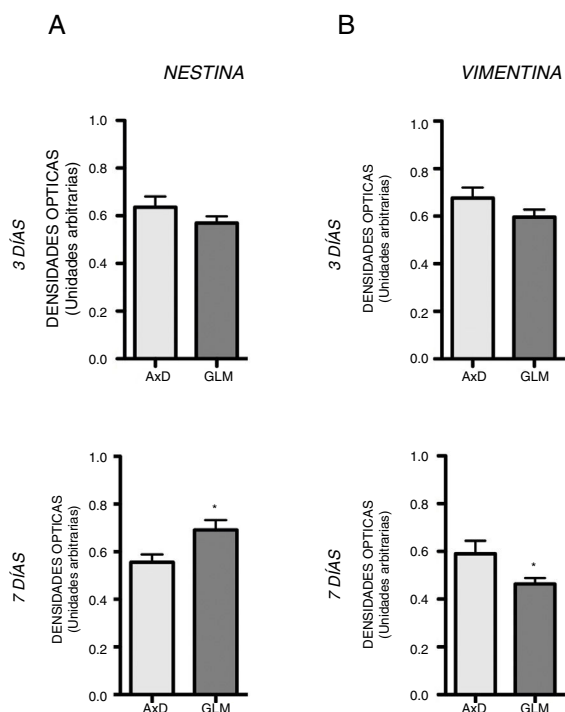


Figura 2 Expresión de nestina y vimentina. Los gráficos muestran la expresión de nestina y vimentina en células transfectadas y de GLM, mostrando al tercer día de diferenciación niveles similares, pero al séptimo día se observan diferencias en la expresión de los marcadores. Las células con mutación de GFAP muestran un comportamiento que en un caso pretende compensar una posible diferenciación alterada y en el caso de GLM una tendencia confirmar su naturaleza de estirpe glial. Los gráficos muestran la media + error estándar, * $p < 0,05$.

de GLM extirpados quirúrgicamente, los hemos sometido al mismo procedimiento in vitro. Efectivamente, ambos tipos celulares muestran un incremento de NG2 y GFAP frente a WT^{12,13}.

En algunos GLM se han descrito células que expresan marcadores de células OPC como son NG2 y PDGFR- α , ambos marcadores distintivos de la glía NG2²⁴⁻²⁶ y ello ha reforzado la hipótesis del papel de NG2 en esta neoplasia²⁷. Sin embargo, estas células también expresan nestina y GFAP y por lo tanto no pueden ser identificadas como esta forma de glía²⁸. La coexpresión de nestina y NG2 también ha sido descrita en GLM²⁹. Las células de gliomas, que son capaces de diferenciarse, han sido consideradas como iniciadoras^{30,31} y por ello las hemos comparado con las neuroesferas transfectadas. En nuestro modelo, el proceso de diferenciación de GLM supone el incremento de la expresión de NG2 y GFAP, de forma similar a lo que hemos descrito previamente en AxD⁹. Dado que las mutaciones de GFAP deben condicionar el aumento de expresión de esta proteína y no de nestina, hemos comprobado la correlación de esta proteína con NG2 y, así, mientras que en GLM existe una tendencia ascendente de nestina con la diferenciación, en AxD la tendencia parece ser inversa, lo que no ocurre con la GFAP ni con la expresión de VIM, en que la tendencia a disminuir aparece en ambos tipos celulares, aunque está presente, probablemente porque la mayor expresión de un neurofilamento intermedio

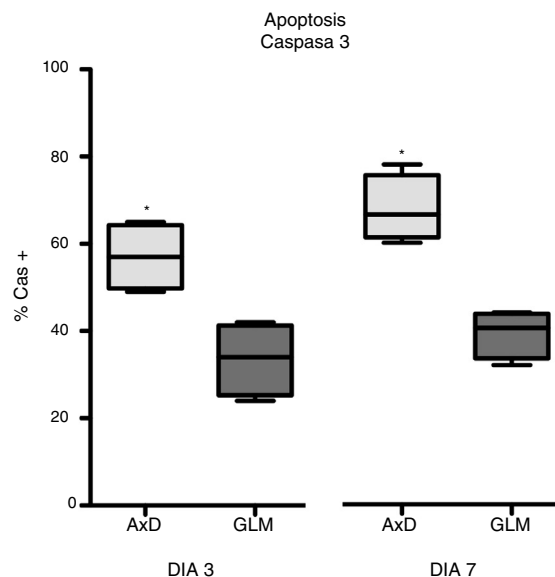


Figura 3 Expresión de caspasa 3. El gráfico muestra un claro aumento tendencia de las células transfectadas desde el día 3 en el % de células Cas+, al compararlas con las células procedentes de los GLM; este evento fue más evidente al séptimo día de diferenciación, donde las células de AxD prácticamente duplicaban el porcentaje observado en las células GLM. Los gráficos muestran la media + error estándar, * $p < 0,05$.

se acompaña de la expresión de los otros^{31,32} lo que ya ha sido descrito en modelos de AxD³³. Mientras que las células AxD generan por la diferenciación la expresión muy alta de Olig2, en las células GLM, la expresión está presente, lo que ya había sido descrito, aunque sea inferior. Sin embargo, el dato comparativo que parece de mayor interés es la diferencia en la expresión de Cas3 entre ambos tipos celulares. Estas células generan una expresión de Cas3 y, así, al séptimo día de diferenciación el 67,75% de las células transfectadas son Cas+; mientras que en las células procedentes de GLM solo lo eran el 39,25%. La asociación de un incremento de Cas3 en AxD ya ha sido descrita previamente³⁴. La expresión de procaspasa-3 influye en la resistencia de las OPC al estrés oxidativo³⁵ y en consecuencia la mayor expresión de Cas3 podría reducir esta resistencia, aunque dependiendo el grado de expresión de Cas3 se ha planteado que su incremento puede ser neuroprotector^{36,37}. En la esclerosis múltiple, el estrés oxidativo en las lesiones también puede resultar en la muerte de las OPC³⁸. El estrés oxidativo, que se observa en los astrocitos que expresan la GFAP mutada, podría incrementar la transcripción procedente del gen de GFAP, con un mecanismo no conocido, lo que contribuiría aún más al acúmulo de GFAP³³. La proteína NG2 tiene un papel protector frente a la apoptosis, ya factores apoptóticos de la vía intrínseca que aparecen por estrés oxidativo³⁹ se unen en el citoplasma al motivo PDZ de NG2, lo que aumentaría la resistencia de las células de estirpe oligodendrocitaria⁴⁰. Estos datos señalan la necesidad de conocer con mayor detalle cuál es el papel que puede tener la expresión de Cas3 en la AxD. Este estudio tiene por objeto conocer las consecuencias de la coexpresión de GFAP y NG2 en 2 tipos celulares y que son muy distintos para poder comprender si muestran mecanismos distintos. Sin embargo, el

estudio tiene 2 claras limitaciones que deben ser consideradas en el momento de interpretar los hallazgos. En primer lugar, una línea celular procede de neuroesferas obtenidas de rata, y la segunda de células humanas extraídas de tumores intervenidos a pacientes con gliomas indiferenciado y por lo tanto deben tenerse en cuenta las diferencias de especie entre las células. En segundo lugar, a ambos tipos celulares se les ha aplicado el mismo procedimiento *in vitro* de diferenciación, que en el caso de las células de GBM no tiene lugar en el paciente. A pesar de estas limitaciones metodológicas, el estudio nos permite establecer una serie de conclusiones que pueden ser interesantes para comprender qué puede suceder en el paciente con AxD, y que serían muy difíciles de obtener de otra manera. En primer término, ambas células coexpresan GFAP y NG2 que son potenciadas por la diferenciación y que cuando se compara con la expresión de nestina, los comportamientos son distintos lo que favorece mantener la hipótesis de un papel propio de la GFAP en las células NG2/GFAP producidas *in vitro* por la transfección de las mutaciones de AxD. En segundo lugar, el incremento de células Cas3+ por la diferenciación en las células transfectadas frente a las células de GLM, lo que plantea una posible vía de actuación en AxD.

Contribuciones de los autores

Diseño del estudio: UG-P, SS-P, JM-G-v, JBA y JM-G.a

Obtención de muestras de glioma: JBA.

Construcción del plásmido hGFAPR88C y transfecciones: SS-P.

Microscopia y estudio molecular: UG-P, MD, SS-P y JM-G-v.

Análisis estadístico: UG-P, JAMG y JM-G.

Análisis de resultados: todos los autores.

Figuras: UG-P.

Borrador manuscrito: JAMG, UGP, JM-G.

Revisión y aprobación del manuscrito: todos los autores.

Conflicto de interés

Los autores declaran que la investigación se realizó en ausencia de relaciones comerciales o financieras que pudieran interpretarse como un posible conflicto de intereses.

Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento a Irene Borredá por su experta asistencia técnica; al Servicio de Microscopía Confocal del Centro de Investigación Príncipe Felipe y de la Universidad Complutense de Madrid; al Dr. Guillermo Velasco de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid por su apoyo en el cultivo de las muestras de GLM. Al Dr. Michel Brenner por facilitar los plásmidos mutados AxD; y a la Fundación Ayuda-Juanma por la colaboración en la financiación de este estudio.

Bibliografía

- Sosunov AA, McKhann GM 2nd, Goldman JE. The origin of Rosenthal fibers and their contributions to astrocyte pathology in Alexander disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2017;5:27.
- Quintan RA, Brenner M, Goldman JE, Messing A. GFAP and its role in Alexander disease. *Exp Clin Res.* 2007;313:2077–87.
- Mignot C, Boespflug-Tanguy O, Gelot A, Dautigny A, Pham-Dinh D, Rodriguez D. Alexander disease: Putative mechanisms of an astrocytic encephalopathy. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:369–85.
- Der Perng M, Su M, Fang Wen S, Li R, Gibbon T, Prescott AR, et al. The Alexander disease-causing glial fibrillary acid protein mutant, R416W, accumulates into Rosenthal fibers by a pathway that involves filament aggregation and the association of alpha-B cristalin and HSP27. *Am J Hum Gen.* 2006;79:197–213.
- Cho W, Messing A. Properties of astrocytes cultured from GFAP over-expressing and GFAP mutant mice. *Exp Cell Res.* 2009;315:1260–72.
- Gómez-Pinedo U, Sirerol-Piquer MS, Duran-Moreno M, Matias-Guiu J. Myelin changes in Alexander disease. *Neurologia.* 2017, <http://dx.doi.org/10.1016/j.nrl.2017.01.019>, pii: S0213-4853(17)30108-1.
- Olabarria M, Putilina M, Riemer EC, Goldman JE. Astrocyte pathology in Alexander disease causes a marked inflammatory environment. *Acta Neuropathol.* 2015;130:469–86.
- Kanski R, Sneeboer MA, van Bodegraven EJ, Sluijs JA, Kropff W, Vermunt MW, et al. Histone acetylation in astrocytes suppresses GFAP and stimulates a reorganization of the intermediate filament network. *J Cell Sci.* 2014;127:4368–80.
- Gómez-Pinedo U, Sirerol-Piquer MS, Duran-Moreno M, García-Verdugo JM, Matias-Guiu J. Alexander disease mutations produce cells with co-expression of GFAP and NG2 in neurosphere cultures and inhibit differentiation into mature oligodendrocytes. *Front Neurol.* 2017;8:255, <http://dx.doi.org/10.3389/fneur.2017.00255>.
- Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. *Brain Res Rev.* 2011;67:147–56.
- Liu Y, Wu Y, Lee JC, Xue X, Pevny LH, Kaprielian Z, et al. Oligodendrocyte and astrocyte development in rodents: An *in situ* and immunohistological analysis during embryonic development. *Glia.* 2002;40:25–43.
- Chekenya M, Rooprai HK, Davies D, Levine JM, Butt AM, Pilkington GJ. The NG2 chondroitin sulfate proteoglycan: Role in malignant progression of human brain tumours. *Int J Dev Neurosci.* 1999;17:421–35.
- Svendsen A, Verhoeff J, Immervoll H, Brogger JC, Kmiecik J, Poli A, et al. Expression of the progenitor marker NG2/CSPG4 predicts poor survival and resistance to ionising radiation in glioblastoma. *Acta Neuropathol.* 2011;122:495–510.
- Lama G, Mangiola A, Proietti G, Colabianchi A, Angelucci C, D'Alessio A, et al. Progenitor/stem cell markers in brain adjacent to glioblastoma: GD3 ganglioside and NG2 proteoglycan expression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2016;75:134–47.
- Al-Mayhany MT, Grenfell R, Narita M, Piccirillo S, Kenney-Herbert E, Fawcett JW, et al. NG2 expression in glioblastoma identifies an actively proliferating population with an aggressive molecular signature. *Neuro Oncol.* 2011;13:830–45.
- Biname F, Sakry D, Dimou L, Jolivel V, Trotter J. NG2 regulates directional migration of oligodendrocyte precursor cells via Rho GTPases and polarity complex proteins. *J Neurosci.* 2013;33:10858–74.
- Chekenya M, Krakstad C, Svendsen A, Netland IA, Staalesen V, Tysnes BB, et al. The progenitor cell marker NG2/MPG promotes chemoresistance by activation of integrin-dependent PI3K/Akt signaling. *Oncogene.* 2008;27:5182–94.

18. Wippold II, Perry A, Lennerz J. Neuropathology for the neuroradiologist: Rosenthal fibers. *Am J Neuroradiol*. 2006;27:9508–961.
19. Belachew S, Chittajallu R, Aguirre AA, Yuan X, Kirby M, Anderson S, et al., Gallo V. Postnatal NG2 proteoglycan-expressing progenitor cells are intrinsically multipotent and generate functional neurons. *J Cell Biol*. 2003;161:169–86.
20. Komitova M, Zhu X, Serwanski DR, Nishiyama A. NG2 cells are distinct from neurogenic cells in the postnatal mouse subventricular zone. *J Comp Neurol*. 2009;512:702–16.
21. Stallcup WB, Beasley L. Bipotential glial precursor cells of the optic nerve express the NG2 proteoglycan. *J Neurosci*. 1987;7:2737–44.
22. Walton NM, Sutter BM, Chen HX, Chang LJ, Roper SN, Scheffler B, et al., Steindler DA. Derivation and large-scale expansion of multipotent astroglial neural progenitors from adult human brain. *Development*. 2006;133:3671–81.
23. Liu R, Zhang S, Yang H, Ju P, Xia Y, Shi Y, et al. Characterization and therapeutic evaluation of a Nestin⁺ CNP⁺ NG2⁺ cell population on mouse spinal cord injury. *Exp Neurol*. 2015;269:28–42.
24. Chekenya M, Enger PO, Thorsen F, Tysnes BB, Al-Sarraj S, Read TA, et al. The glial precursor proteoglycan, NG2, is expressed on tumour neovasculature by vascular pericytes in human malignant brain tumours. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2002;28:367–80.
25. Ligon KL, Alberta JA, Kho AT, Weiss J, Kwaan MR, Nutt CL, et al. The oligodendroglial lineage marker OLIG2 is universally expressed in diffuse gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004;63:499–509.
26. Sugiarto S, Persson AI, Munoz EG, Waldburger M, Lamagna C, Andor N, et al. Asymmetrydefective oligodendrocyte progenitors are glioma precursors. *Cancer Cell*. 2011;20:328–40.
27. Barrantes-Freer A, Kim E, Bielanska J, Giese A, Mortensen LS, Schulz-Schaeffer WJ, et al. Human glioma-initiating cells show a distinct immature phenotype resembling but not identical to NG2 glia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2013;72:307–24.
28. Brat D, Prayson R, Ryken T, Olsson JJ. Diagnosis of malignant glioma: Role of neuropathology. *J Neuro-Oncol*. 2008;89:287–311.
29. Ignatova TN, Kukekov VG, Laywell ED, Suslov ON, Vrionis FD, Steindler DA. Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia*. 2002;39:193–206.
30. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, de Vitis S, et al. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res*. 2004;64:7011–21.
31. Parry DA, Steinert PM. Intermediate filaments: Molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism. *Q Rev Biophys*. 1999;32:99–187.
32. Quinlan RA, Franke WW. Molecular interactions in intermediate-sized filaments revealed by chemical cross-linking. Heteropolymers of vimentin and glial filament protein in cultured human glioma cells. *Eur J Biochem*. 1983;16:477–84.
33. Liem RK, Messing A. Dysfunctions of neuronal and glial intermediate filaments in disease. *Clin Invest*. 2009;119:1814–24.
34. Chen YS, Lim SC, Chen MH, Quinlan RA, Perng MD. Alexander disease causing mutations in the C-terminal domain of GFAP are deleterious both to assembly and network formation with the potential to both activate caspase 3 and decrease cell viability. *Exp Cell Res*. 2011;317:2252–66.
35. Frago G, Martinez-Bermudez AK, Liu HN, Khorchid A, Chemtob S, Mushynski WE, et al. Developmental differences in HO-induced oligodendrocyte cell death: Role of glutathione, mitogen-activated protein kinases and caspase 3. *J Neurochem*. 2004;90:392–404.
36. D'Amelio M, Cavallucci V, Cecconi F. Neuronal caspase-3 signaling: Not only cell death. *Cell Death Differ*. 2010;17:1104–14.
37. Snigdha S, Smith ED, Prieto GA, Cotman CW. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death. *Neurosci Bull*. 2012;28:1–14.
38. Haider L, Fischer MT, Frischer JM, Bauer J, Hoftberger R, Botond G, et al. Oxidative damage in multiple sclerosis lesions. *Brain*. 2011;134:1914–24.
39. Suzuki Y, Imai Y, Nakayama H, Takahashi K, Takio K, Takahashi R. A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*. 2001;8:613–21.
40. Maus F, Sakry D, Binamé F, Karraam K, Rajalingam K, Watts C, et al. The NG2 proteoglycan protects oligodendrocyte precursor cells against oxidative stress via interaction with OMI/HtrA2. *PLoS One*. 2015;10:e0137311.