

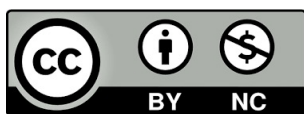
Diego Sola Fraca

Estudio de los factores implicados
en la transmisión, susceptibilidad
genética y diagnóstico de las
enfermedades priónicas

Director/es

Badiola Díez, Juan José
Acín Tresaco, Cristina

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



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA
TRANSMISIÓN, SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y
DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES
PRIÓNICAS

Autor

Diego Sola Fraca

Director/es

Badiola Díez, Juan José
Acín Tresaco, Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

2024



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles
Emergentes. Departamento de Patología Animal.
Facultad de Veterinaria

ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN, SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Memoria de tesis presentada por el graduado

Diego Sola Fraca

para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza

Directores

Cristina Acín Tresaco

Juan José Badiola Díez

Zaragoza, noviembre 2023



**Departamento de
Patología Animal**
Universidad Zaragoza



**Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes**
Universidad Zaragoza

Dña. CRISTINA ACÍN TRESACO, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**, Director del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes y Profesor Honorario del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN:

Que D. Diego Sola Fraca ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada “**ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN, SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS**” que se corresponde con el plan de investigación aprobado por la Comisión de Doctorado y cumple con los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza, por lo que autorizamos su presentación para que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente.

En Zaragoza, a 17 de noviembre de 2023.

Fdo: Cristina Acín Tresaco

Fdo: Juan José Badiola Díez

Este trabajo ha sido posible gracias a un contrato predoctoral del Gobierno de Aragón (IIU/1408/2018), cofinanciado por el Fondo Social Europeo (Programa Operativo FSE Aragón 2014-2020), y gracias a la Universidad de Zaragoza, que ha aportado las instalaciones y a la cual pertenecen los Directores del trabajo. Asimismo, este trabajo ha sido posible gracias al apoyo de los siguientes programas y sus proyectos:

- Programa de Cooperación Transfronteriza España, Francia, Andorra con contribución del Fondo Europeo de Desarrollo Regional (POCTEFA-FEDER): Proyecto “Red de Investigación Transfronteriza en Enfermedades Priónicas Humanas y Animales”, EFA 148/16 (Redprion).
- Proyecto A05_20R: “Enfermedades Priónicas, Vectoriales Y Zoonosis Emergentes.



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza



Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes
Universidad Zaragoza

Dña. CRISTINA ACÍN TRESACO, Profesora Titular del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza y **D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ**, Director del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes y Profesor Honorario del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN:

Que D. Diego Sola Fraca bajo nuestra dirección, presenta el trabajo correspondiente a su Tesis Doctoral titulada **“ESTUDIO DE LOS FACTORES IMPLICADOS EN LA TRANSMISIÓN, SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA Y DIAGNÓSTICO DE LAS ENFERMEDADES PRIÓNICAS”** para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza con “Mención Internacional”. Cumpliendo con la legislación vigente, este trabajo incluye dos informes de los siguientes expertos doctores pertenecientes a instituciones extranjeras:

- Dra. Leonor Orge, Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Unidade de estratégica de Investigação e Serviços de Produção e Saúde Animal, Av. República, Quinta do Marques, 2780-157 Oeiras, Portugal. Doctora por la Trasos-Montes e Alto Douro University el 16/9/2005.
- Dr. Olivier Andreoletti, Investigador Principal de la Unité Mixte de Reserche, Institut national de la recherche agronomique (INRAe), École Nationale Vétérinaire de Toulouse UMR1225IHAP (Interactions hotes-agents pathogènes), 23, Chemin des Capelles, 31076 Toulouse, Francia. Doctor por la Universidad de Paris Sud (XI) el 27/4/2004.

Asimismo, avalamos la realización por parte del doctorado de una estancia en una institución de investigación extranjera durante tres meses:

Estancia desde 28 de agosto hasta el 1 de diciembre de 2022 (95 días) en el National Veterinary Institute (SVA), Uppsala, Sweden bajo la supervisión de la Dra. Dolores Gavier-Widén, en la que el estudiante de doctorado trabajó en el uso de la técnica de Inmunohistoquímica y valoración de los diferentes patrones inmunohistoquímicos encontrados en todos los alces europeos positivos a la enfermedad crónica caquetizante. Por tanto, cumple con los requisitos necesarios para optar al Título de Doctor con Mención Internacional.

En Zaragoza, noviembre de 2023.

Fdo: Juan José Badiola Díez

Fdo: Cristina Acín Tresaco



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a /Doctoral Student: DIEGO SOLA

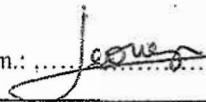
Título de la Tesis / Title of the Thesis:

Estudio de los factores implicados en la transmisión, susceptibilidad genética y diagnóstico de las enfermedades priónicas

D./D^a MARIA LEONOR ORGE

- Como del Tribunal que ha juzgado la tesis doctoral / As of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD thesis
- Como evaluador de la tesis con mención de doctorado internacional o europea / As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD)
- emite el informe que sigue / issues the following report.

En Oeiras, a 16 de Octubre de 2023

Firma/Sign.: 

Informe de Valoración para la Comisión de Doctorado / Evaluation Report.

Comente la originalidad del trabajo presentado, la relevancia del mismo dentro del dominio al que pertenece la tesis, la metodología y la calidad de la memoria presentada. Incluya, en su caso, los comentarios que desee hacer llegar al doctorando (adjunte las hojas que sean necesarias). Discuss the originality and relevance of the work as well as the quality of the dissertation. You may include any comments that you want to send to the PhD student (please, attach as many pages as necessary).

I have read with great interest the Ph.D. thesis of Mr. Diego Sola entitled "Estudio de los factores implicados en la transmisión, susceptibilidad genética y diagnóstico de las enfermedades priónicas".

The Thesis is well organized and balanced, including an updated review of the literature on Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs), highlighting the issues targeted in the experimental studies. Those experiments comprise four studies with well-established objectives, appropriate methodologies, clear description, presentation and discussion of the obtained results. These reveal the demanding scientific and technical work of the candidate in accomplishing plenty of data, and different methodologies, altogether analyzed and considered in the general discussion chapter prompting ten main conclusions providing important new features in the field of the TSEs.

Moreover, two of the four studies have already been published in the high-quality journal *Veterinary Research* focusing on all aspects of infectious diseases and host-pathogen interaction in animals.

In the first study, the candidate presents a thorough human transgenic mice bioassay inoculated intracerebrally with caprine BSE and bovine BSE in which he evaluates the infectivity of goat tissues and fluids (with different genotypes at codon 222) that were negative by conventional diagnostic techniques to assess the potential risk of BSE infection in humans due to the consumption of products derived from small ruminants. The candidate was able to demonstrate the high transmission capacity of caprine BSE compared to bovine BSE, to detect prion amplification by protein misfolding cyclic amplification (PMCA) mice inoculated with negative tissues (semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver and whole blood) from goats infected with goat BSE. Regarding the goat *prnp* genotype, he observed that the presence of glutamine at codon 222 plays a key role in terms of the transmission barrier to humanized mice and of peripheral distribution in different goat tissues. These results are of great interest, showing that the continuation of breeding programs for the K222 allele will be important in the framework of TSE control.

In the second study, published in the journal *Veterinary Research*, the PhD candidate contributes to the understanding of the resistance of specific PrP^c sites of the horse to the spread of prions, as horses, like canids and leporids, are animals that have historically been considered resistant to TSEs. He demonstrated in several horse breeds that the prnp gene has a low genetic variability in coding regions and discovered 3 new polymorphisms, one synonymous and two non-synonymous. Furthermore, using different software he determines the impact of these new polymorphisms and the propensity for amyloid aggregation, showing that the amino acidic change N175K could produce the greatest instability at the level of the structure but none of these changes implies a greater susceptibility to amyloid propensity.

The third study, also published in the journal *Veterinary Research*, helps the neuropathological characterization of the recently identified CWD in Nordic moose, an issue very important to understanding how the different strains of Chronic wasting disease (CWD) detected in Europe behave biologically in European moose contributing for future diagnosis and identification of several presentations of CWD cases in moose. By immunohistochemistry with a panel of five anti-PrP mAbs generated against different parts of PrP, including the N-terminal tail of PrP, the candidate presents a phenotypic heterogeneity of the different cases among European moose and different from that described in North America, suggesting the possible involvement of different strains regardless of the country of origin of the animals.

The last study is the first to provide a comparison of sleep-wake patterns and the distribution of EEG spectra in healthy and scrapie-infected sheep. The PhD candidate establishes for the first time the description of sleep disturbances caused by scrapie in sheep by an innovative and non-invasive material in animal research allowing investigation of the sleep/wake cycle of healthy sheep and sheep with scrapie. The results show an increase in sleep fragmentation in clinical animals compared to preclinical and control animals, thus prion diseases also produce sleep disturbances in animals and polysomnography could be a diagnostic tool of interest in clinical and preclinical cases of prion diseases, opening a new field for further research into sleep disturbances regarding different prion strains and to clarify the role of the pathological prion protein in normal sleep function.

In conclusion, I strongly recommend this work be submitted for examination as a Doctoral Thesis and to endorse the international doctorate title.

I also would like to congratulate the author for his high-quality research and wish him the very best with the public defence of the Thesis and for his professional future.

Maria Leonor dos Santos Diniz Orge (DVM, PhD)

Researcher

Laboratory of Pathology, TSEs diagnosis sector

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P. (INIAV),

Av. República, Quinta do Marquês, 2780-157 Oeiras, Portugal,

Phone +351214403500



INFORME VALORACIÓN TESIS DOCTORAL / PhD THESIS ASSESSMENT REPORT

Doctorando-a /Doctoral Student: Diego SOLA FRACA

Título de la Tesis / Title of the Thesis:

Estudio de los factores implicados en la transmisión, susceptibilidad genética y diagnóstico de las enfermedades priónicas

Dr Olivier ANDREOLETTI

Como del Tribunal que ha juzgado la tesis doctoral / As of the Doctoral Committee that has evaluated the PhD thesis

Como evaluador de la tesis con mención de doctorado internacional o europea / As external examiner of the PhD thesis (International or European Mention PhD emite el informe que sigue / issues the following report.

En Toulouse, el 24 /10 / 2023

Firma/Sign.:

Informe de Valoración para la Comisión de Doctorado / Evaluation Report.

I have read with interest the Ph.D. thesis of Diego Sola Fraca entitled "Estudio de los factores implicados en la transmisión, susceptibilidad genética y diagnóstico de las enfermedades priónicas".

In the thesis literature review, Mr. Sola revises, with up to date references, the general aspects of prion diseases such as the etiologic agent, PrP^C to PrP^{Sc} conversion mechanisms, pathogenesis, genetic susceptibility control and diagnosis; giving special relevance to the specific topics studied in this thesis.

The manuscript is well structured and clearly written, enriched with figures supporting the principal statements of the manuscript. The thesis is organized in four studies, two of them already published in an excellent Veterinary Sciences journal (*Veterinary Research*).

In the first study, Mr. Sola Fraca presents a work entitled 'in vitro detection of Caprine BSE in asymptomatic PrP humanized mice after inoculation with negative goat tissues.' which intended to better assess the risk of human exposure to BSE agent through consumption of products originating from asymptomatic goats that had been challenged with this Prion strain. The study relied on the use of bioassay (in human PrP transgenic mouse models) and in-vitro amplification of Prions by PMCA.

In the second study, he investigated the impact of various *PRNP* polymorphism on the stability (misfolding capacity) of horse Prion protein (study entitled: 'Prion protein gene (*PRNP*) novel polymorphisms and the stability of the resultant prion protein in different horse breed'). The objective of this study, which mostly relied on *in-silico* modelling of the PrP^C/PrP^{Sc} conformational stability, was to identify potential polymorphism susceptible to influence the susceptibility/resistance of horse to prion infection. The study was recently published in Veterinary research (October 2023)

In his third study, Mr. Sola Fraca characterized the 'Heterogeneity of pathological prion protein accumulation in the brain of moose (*Alces alces*) from Norway, Sweden and Finland with chronic wasting disease'. The goal of the study was to document the strain diversity of Prions responsible for CWD cases in Moose in Scandinavian countries. The work relied on in depth analysis of pathological changes in a panel of natural CWD cases and was published in Veterinary research (September 2023).

In his last study, Mr Sola Fraca investigated the ‘Sleep disturbance in clinical and preclinical scrapie-infected sheep measured by polysomnography’. In this clinical study the PhD candidate used original and complex technics (in large animal models) for the characterization of circadian cycles (electroencephalography, electromyography....) in scrapie infected sheep (natural disease). This interesting work validated the existence of perturbation in the sleep cycles (sleep fragmentation) and opens field for the use of sheep scrapie model in this particular domain.

Overall, Mr Sola Fraca Doctoral thesis work covers a wide range of topics and relied on the use of a large panel of methodologies/approaches.

In my opinion, the thesis demonstrates Mr Sola Fraca’s full abilities to produce high quality scientific research work, and meets all the requirements for obtaining a PhD degree.

I therefore fully support the submission of the manuscript and research work for examination as a Doctoral Thesis.

Sincerely yours

Dr Olivier Andreoletti
Head of Prion Research Unit
UMR INRA ENVT 1225, Interactions Hôtes Agents Pathogènes
Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse
23 chemin des capelles
31076 Toulouse - France

On October 24, 2023





Universidad
Zaragoza

CERTIFICADO DE ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN

El abajo firmante, director del departamento de Patología animal..... de la Universidad de Zaragoza o coordinador del programa de doctorado en Medicina y Sanidad Animal..... de la Universidad de Zaragoza (elijase una de las dos opciones),

CERTIFICA que

D/D.^a Diego Sola Fraça....., procedente de la Universidad de Zaragoza..... ha realizado desde el 28-ago-2022.....(fecha de inicio) hasta el 01-dic-2022.....(fecha final)

una estancia de investigación enmarcada en el desarrollo de su tesis doctoral en el departamento/instituto/centro de National Veterinary Institute, Sweden (SVA. (identifíquese lo que proceda).

Y para que así conste, firmo la presente

en Zaragoza, a de de 201

<p>Fdo.:</p> <p><input type="checkbox"/> El director del Departamento</p> <p><input type="checkbox"/> El coordinador del programa de doctorado</p>	<p>Visto bueno del responsable/tutor Durante la estancia</p>
--	--

A mi familia,
a Sara

AGRADECIMIENTOS

Después de unos cuantos meses nos encontramos en el final de una etapa, una dura y larga etapa, pero una de las mejores que he vivido en mi vida. Nada tiene que ver el chico de ahora con ese recién graduado que se reunió por primera vez con sus dos directores.

En primer lugar, quiero agradecer esta tesis a todas las personas que me han ido apoyando desde el primer momento que pisé este centro hasta el final.

Como bien he comentado, todo comenzó en una reunión para elegir mi trabajo de final de grado en la cual conocí más personalmente a mis dos directores de tesis, la Dra. Cristina Acín Tresaco y el Dr. Juan José Badiola Díez. Quiero empezar dándoles las gracias a ellos.

A Juan, por ayudarme a empezar esta maravillosa etapa en este centro y permitirme desarrollarme como investigador en su gran equipo. Además, también quiero darte las gracias porque para mí has sido como un padre, acompañándome en cada momento, tanto bueno como malo. Cada anécdota tuya marcada de sabiduría y experiencia valen oro. Mil gracias por todo Juan.

A Cris, por todo lo que has hecho por mí, entré aquí sabiendo que eras una magnífica profesora (sin lugar a dudas la mejor de toda la facultad), pero salgo sabiendo que eres mucho más que eso, eres la mejor profesional que he conocido y lo más importante, una de las mejores personas. Cris, millones de gracias por todos los momentos vividos y eres una de las mejores cosas que me llevo.

Muchas gracias también a todas las personas del centro que tanto me han ayudado durante todo este proceso. Gracias a Rosa por todos los viajes y congresos y por todos los buenos consejos, a Inma por su confianza, a Eva por los buenos ratos en el laboratorio, a Marta por siempre tener muy buenas palabras hacia mí, a Nico por su gran ayuda en el microscopio (y también con la cámara...). Gracias a Antonia por su simpatía, siempre sabía cómo sacarnos una sonrisa, se te echa de menos. A los técnicos de laboratorio, Sandra, Sonia, Dani y Cata, por

enseñarme y ayudarme siempre con una sonrisa y por sacar tiempo siempre para los demás, no sé qué habría sido de mí con tantos peces y gusanos. A Mara, por siempre alegrarnos las mañanas.

A África, gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado por más inverosímil que fuera el asunto, pero principalmente gracias por haber sido un apoyo fundamental para la realización de mi tesis, no sé qué habría sido de mí sin esas risas en los cafés que nos alegran tanto la vida. De verdad, gracias por ser como eres.

A Belén, no sé ni que decirte... probablemente, y sin el probablemente eres la persona que más me ha ayudado en mi trabajo. Sin ti no habría sido posible ni la mitad de la mitad de ésta tesis, pero no solo por todo el trabajo que has hecho conmigo sino por todos los buenos ratos, tus consejos que valen oro y como olvidar los viajes en furgoneta. Sin duda alguna, eres de las mejores personas que he conocido en todos los sentidos.

Por supuesto, gracias infinitas a mis compañeras de doctorado, que se han enfrentado a todas las dificultades que nos han ido surgiendo y haber disfrutado tanto como yo de este camino.

A Tomás, por enseñarme tanto y tan bien en el laboratorio y por guiarme en los primeros pasos de mi camino en la investigación. A Alicia, por ser siempre una referente en todo, y por ayudarme tantísimo estos últimos años, sin duda eres un pilar fundamental de mi tesis y una gran amiga. A Isabel, porque el centro no es lo mismo sin ti, eras la alegría, la espontaneidad, los agobios y los nervios, pero sin duda nos llenabas de felicidad siempre con tus historias, por aquí no paramos de "citarte". A Mirta, por todos los momentos vividos tanto dentro como fuera del laboratorio, una de las mejores recompensas de este camino ha sido conocerte. A Marina, porque sin ti esta tesis no hubiera sido lo mismo, has sido mi gran apoyo desde el primer día que entré, siempre dispuesta a todo y siempre con una sonrisa. Empezamos siendo compañeros,

pero te has convertido en una amiga fundamental en mi vida, gracias. A Adelaida, Sonia, Fernando, Jenny y Paula por su amabilidad y siempre buena voluntad.

A Rody, pese a que coincidimos poco tiempo, gracias por todo lo que me has enseñado y ayudado éste último año, sé que es el comienzo de una gran amistad.

A Dolores y a todo su equipo, por acogerme tan bien en Suecia y ser siempre tan amable conmigo, muchísimas gracias.

A quienes pasaron por el Centro antes que yo y con los que coincidí un tiempo: a Jose Luís, por su ayuda los primeros meses de mi tesis, no sé qué habría hecho sin ti, a Moisés y Oscar. A mis compañeros de otros departamentos, por los buenos ratos pasados en la Facultad: Javi, Ricardo y Ana. También a los profesores de la unidad que siempre me han ayudado en todo y siempre han tenido buenas palabras hacia mí: Mari Cruz, Dani, Jósan, Lluís, Marcelo. A Santi, por ayudarme y sobre todo enseñarme tantísimo en la sala de necropsias. A Charo, por siempre recibirme con una sonrisa. A Luis y Antonio del SAEA por su implicación en el estudio del sueño en ovejas, no sé qué habría hecho sin vosotros. Gracias a todos.

Dar las gracias a mis grandes amigos de toda la vida, a Javi, por todo su saber estar y su templanza frente a cualquier adversidad, a Jaime, por su forma de ver la vida y por ser siempre el primero cuando lo necesitas, a Javi, por sus risas y tonterías que me alegran la vida, a Diego por ser tan buena persona siempre con todo el mundo y, por último, a mi Héctor, gracias por todos estos 27 años vividos a tu lado, una pieza indispensable en mi vida y también en ésta tesis. Gracias también a María, Eva y Erika por todos los momentos que hemos vivido y por tener tan certeras y buenas palabras siempre. A Jose, por haber sido un gran descubrimiento estos últimos años, por tus consejos te has convertido en más que un amigo. A Cristian, porque siempre que estoy contigo se me olvida todo lo demás, por ser otra de las piezas fundamentales en mi vida, por siempre tener tiempo para mí y porque siempre serás mi Cristian. A Moni, por estar conmigo

desde pequeño hasta el día de hoy, siempre sabiendo que decir y hacer en cada momento. A Sara, Paula, Carol por todos los buenos ratos vividos todos estos años. A todos, os quiero.

Quiero dar las gracias a toda mi familia, a mi hermano Rubén por siempre estar a mi lado pasen los años que pasen y por tu habilidad haciendo que me olvide de todo lo malo, a Jessi por ser como una hermana más en mi vida y por siempre estar ahí cuando la he necesitado. A Dani y Jara por siempre sacarme una sonrisa y alegrarme cualquier momento con esa locura e inocencia tan preciosa. A mis tíos, Elena y Kiko, a mis primas, Sara y Marta por siempre apoyarme en todo con una sonrisa y siempre estar cuando se les necesita. A Loly y Juanky por ser como mis segundos padres, por aconsejarme y cuidarme siempre de la mejor forma, nunca podré estar lo suficientemente agradecido por todo lo que me dais, mil gracias. A Bayron, por ser como otro hermano más, por siempre estar ahí en cualquier momento tanto bueno como malo, os quiero. A Marisol y Félix por siempre darme sus mejores palabras y hacerme saber cuáles son las cosas realmente importantes. A Pili, Sole, Carlos, Manolo, Chus, Dani, Marta, Alejandro, Ernesto, Lucía, Lucas, por acogerme en vuestra familia y cuidar tanto de mí todos estos años. Os quiero.

A mi padre, Vicente por siempre saber darle el valor suficiente a las cosas que nos pasan, y por siempre tener esa paciencia que le caracteriza, tan necesaria en esta vida.

A mis yayos, por todo lo que me han ayudado siempre, por apoyarme siempre desde pequeño y enseñarme que todo esfuerzo tiene su recompensa, por animarme en todo momento y en especial para acabar mi tesis. Os quiero.

A mi madre, Puri, por ser sin lugar a dudas la persona más luchadora y trabajadora que hay en el mundo, gracias por siempre darme tu aliento, guiarme, ayudarme y convertirme en la persona que soy ahora. No puedo tener mejor madre que tú. Te quiero.

Y, por último, en especial, quiero dar las gracias a Sara, y también a la vida por haberme cruzado en su camino. Sin lugar a dudas, esta tesis jamás la habría empezado ni acabado sin ti, eres la mejor persona que conozco y con esa sonrisa iluminas siempre cualquier mal día. Gracias

por todas las etapas increíbles que hemos vivido hasta ahora, y por todas las que están por venir.

¿Empezamos una nueva juntos? Gracias por siempre sacar lo mejor de mí y ser siempre mis alas.

Te quiero.

A todos, gracias de corazón.

Diego Sola Fraca

Lista de abreviaturas

Lista de abreviaturas

L: Litro	ml: Mililitro	µl: Microlitro
g: Gramo	mg: Miligramo	µm: Micrometro
Ng: Nanogramo	°C: Grado centígrado	M: Molar
mM: Milimolar	h: Hora	m: Minuto
s: Segundo	o/n: Overnight	Å: Angstroms

A

AD	<i>Alzheimer's disease</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Aβ	<i>β-amiloide</i>

B

Bo-BSE	<i>Bovine bovine spongiform encephalopathy</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSE	<i>Bovine spongiform encephalopathy</i>

C

Ca-BSE	<i>Caprine bovine spongiform encephalopathy</i>
Cbl	<i>Cerebellum</i>
CJD	<i>Creutzfeldt-Jacob disease</i>
CNS	<i>Central nervous system</i>
CWD	<i>Chronic wasting disease</i>

D

DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dpi	<i>Days post inoculation/Días post inoculación</i>
Dpl	Proteína Doppel
DTT	<i>Dithiothreitol</i>

E

EA	Enfermedad de Alzheimer
ECC	Enfermedad crónica caquetizante
ECJ	Enfermedad Creutzfeldt-Jakob
EDTA	Ácido etilendiaminatetraacético
EEB	Encefalopatía espongiforme bovina
EEF	Encefalopatía Espongiforme felina
EEG	<i>Electroencephalography</i>
EET	Encefalopatías espongiformes transmisibles
EH	Enfermedad de Huntington
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMG	<i>Electromyography</i>
EOG	<i>Electro-oculography</i>
EP	Enfermedad de Parkinson
ETV	Encefalopatía transmisible del visón
EUE	Encefalopatía de ungulados exóticos

F

Fc	<i>Frontal cortex</i>
----	-----------------------

Lista de abreviaturas

fCJD	<i>Familial Creutzfeldt-Jakob disease</i>
fECJ	Creutzfeldt-Jakob familiar
FFI	Fatal familial insomnia
Fi	<i>Finland</i>
FWD	Cebador Forward
G	
GALT	<i>Gut- Associated Lymphoid Tissue</i>
GPI	<i>Glicosil-fosfatidil-inositol</i>
GSS	<i>Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease</i>
H	
H-BSE	<i>Bovine spongiform encephalopathy type High</i>
Hc	<i>Hippocampus</i>
HD	<i>Huntington's disease</i>
H-E	Hematoxilina y eosina
Ht	<i>Haplotype</i>
HWE	<i>Hardy-Weinberg equilibrium</i>
Hyt	<i>Hypothalamus</i>
I	
iCJD	<i>Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease</i>
iECJ	Creutzfeldt-Jakob iatrogénico
IEF	Insomnio esporádico fatal
IFF	Insomnio familiar fatal
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
IHQ	Inmunohistoquímica
ISAG	<i>International Society for Animal Genetics</i>
K	
kDa	<i>Kilodalton</i>
L	
L-BSE	<i>Bovine spongiform encephalopathy type Low</i>
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LD	<i>Linkage disequilibrium</i>
M	
mAb	<i>Monoclonal antibody</i>
Mes	<i>Mesencephalon</i>
Mo	<i>Medulla oblongata</i>
N	
NAPA	<i>Nonadaptive prion replication</i>
NHP	Encefalopatía espongiforme en primates no humanos
No	<i>Norway</i>
NREM	<i>Non-rapid eye-movement</i>
NVI	<i>Norwegian National Veterinary Institute</i>
O	
ORF	<i>Open reading frame / Marco de lectura abierto</i>
P	
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PBST	<i>Phosphate-buffered saline + 1% Tween 20</i>

Lista de abreviaturas

Pc	<i>Parietal cortex</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction / Reacción en cadena de la polimerasa</i>
PD	<i>Parkinson's disease</i>
PIRIBS	<i>Parallel In Register Intermolecular β-Sheet</i>
PK	Proteinasa K
PMCA	<i>Protein misfolding cyclic amplification/Amplificación cíclica de proteínas mal plegadas</i>
<i>PRND</i>	Gen que codifica la proteína Doppel
<i>PRNP</i>	Gen que codifica la proteína prion
PrP	Proteína prion
PrP 27-30	PrP resistente a PK de 27-30 kDa
PrP ^C	Proteína prion celular
PrP ^{res}	PrP resistente a la digestión con proteasas
PrP ^{Sc}	Proteína prion patológica
PVSPr	Prionopatía variable sensible a la proteasa

R

REM	<i>Rapid Eye Movement</i>
REV	Cebador Reverse

S

SAF	Fibras asociadas a Scrapie
sCJD	<i>Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease</i>
SDS	<i>Dodecilsulfato sódico</i>
sECJ	Creutzfeldt-Jakob esporádico
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
Sho	Proteína Shadoo
SLR	Sistema linforreticular
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso periférico
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
<i>SPRN</i>	Gen que codifica la proteína Shadoo
SSBP/1	<i>Sheep scrapie brain pool 1</i>
SVA	<i>Swedish National Veterinary Institute</i>
Sw	<i>Sweden</i>

T

T	<i>Thalamus</i>
TBE	<i>Tris, Borato, EDTA</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TME	<i>Transmissible mink encephalopathy</i>
TSE	<i>Transmissible spongiform encephalopathies</i>

U

UTRs	<i>Untranslated regions</i>
------	-----------------------------

V

vCJD	<i>Variant Creutzfeldt-Jakob disease</i>
vECJ	Variante de la enfermedad Creutzfeldt-Jakob

W

WB	<i>Western blot</i>
----	---------------------

Lista de abreviaturas

Aminoácidos

A: Alanina
E: Ác. Glutámico
H: Histidina
L: Leucina
P: Prolina
S: Serina
W: Triptófano

C: Cisteína
F: Fenilalanina
I: Isoleucina
M: Metionina
Q: Glutamina
T: Treonina
Y: Tirosina

D: Ác. aspártico
G: Glicina
K: Lisina
N: Asparagina
R: Arginina
V: Valina

Índice general

ÍNDICE GENERAL

1. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	1
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
- Introducción.....	13
- Encefalopatías espongiformes transmisibles en animales	16
• Scrapie.....	16
• Encefalopatía espongiforme bovina	17
• Enfermedad crónica caquetizante	17
- Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos.....	22
• Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos: Hereditarias	22
- Enfermedad de creutzfeldt-jakob familiar	22
- Insomnio familiar fatal	22
- Enfermedad de gerstmann-sträussler-scheinker	23
• Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos: Esporádicas	23
- Enfermedad de creutzfeldt-jakob esporádica.....	23
• Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos: Infecciosas.....	24
- Kuru.....	24
- Enfermedad de creutzfeldt-jakob iatrogénica	24
- Variante de la enfermedad de creutzfeldt-jakob	24
- Etiología.....	26
• La proteína prion celular: PrP ^C	27
• La proteína prion patológica:PrP ^{Sc}	30
• Mecanismo de conversión PrP ^C a PrP ^{Sc}	31
- Barrera de transmisión	34
• Factores que determinan la barrera de transmisión	35
• Caracterización de cepas priónicas.....	37
- Patogenia.....	43
- Factores genéticos.....	49
• Gen <i>PRNP</i>	49
- Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en la especie ovina.....	50
- Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en la especie caprina.....	52
- Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en la especie bovina.....	54
- Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en cérvidos.....	55
- Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en la especie equina.....	56
- Polimorfismos del gen <i>PRNP</i> en la especie humana	57
- Diagnóstico.....	58
• Diagnóstico <i>in vivo</i>	58
- Diagnóstico clínico	58
- Biomarcadores diagnósticos y posible de diagnóstico preclínico	58
• Diagnostico <i>Post-mortem</i>	59
- Examen histopatológico	59
- Técnicas de detección rápida de PrP ^{Sc}	60
- Detección de la PrP ^{Sc} mediante la técnica de Inmunohistoquímica	61

Índice general

- Detección de la PrP ^{Sc} mediante la técnica de Western Blot	62
• Técnicas de Amplificación de Priones	63
• Bioensayo	64
- Enfermedades priónicas y el sueño	65
3. Estudio 1.....	69
• Abstract	71
• Introduction.....	72
• Materials and methods.....	75
• Results	82
• Discussion	92
• References.....	97
4. Estudio 2.....	101
• Abstract	103
• Introduction.....	104
• Materials and methods.....	107
• Results	111
• Discussion	120
• References.....	126
5. Estudio 3.....	131
• Abstract	133
• Introduction.....	134
• Materials and methods.....	138
• Results	144
• Discussion	155
• References.....	161
6. Estudio 4.....	167
• Abstract	169
• Introduction.....	170
• Materials and methods.....	172
• Results	176
• Discussion	180
• References.....	185
7. DISCUSIÓN GENERAL	189
8. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	205
• Conclusiones.....	207
• Conclusions.....	209
9. RESUMEN / ABSTRACT	211
• Resumen.....	213
• Abstract	217
10. ANEXOS	221
11. REFERENCIAS	237

Índice de figuras

Revisión bibliográfica

Figura 1. Hallazgos neuropatológicos característicos de las EET	25
Figura 2. Estructura secundaria de la PrP ^C y PrP ^{Sc}	31
Figura 3. Modelos de replicación de los priones.....	33
Figura 4. Esquema de diferenciación de cepas	42
Figura 5. Representación esquemática de las rutas de neuroinvasión en las EET ...	44
Figura 6. Fases de la técnica PMCA	63

Estudio 1

Figure 1. PrP ^{res} deposits observed in Tg340 mice inoculated with caprine BSE and bovine BSE isolates	87
Figure 2. Western blot analyses of PrP ^{res} in Tg340 mice.....	88
Figure 3. Biochemical analysis of Tg340 PrP ^{res} obtained <i>in vitro</i> after three rounds of PMCA.....	91

Estudio 2

Figure 1. Schematic representation of equine <i>PRNP</i> gene	111
Figure 2. Electropherogram of all SNPs found including the new ones (c.5T>G, c.237T>A, c.544G>A) identified in this study	112
Figure 3. Haplotype network for the horse <i>PRNP</i> gene	115
Figure 4. Hydrogen bonds of horse prion protein (PrP).....	118
Figure 5. Effect of amino acid substitutions N175K and V182I on the electrostatic potential of horse PrP.....	119

Estudio 3

Figure 1. Example of brain areas sampling	140
Figure 2. Differences in PrP ^{Sc} immunolabelling in the thalamus and obex of CWD-affected moose with five different anti-PrP antibodies	145
Figure 3. Intracellular PrP ^{Sc} accumulation in brain sections of moose with CWD.....	146

Índice de figuras

Figure 4. Extracellular PrP ^{Sc} accumulation in brain sections of moose with CWD	147
Figure 5. Neuroanatomical distribution and profiles of PrP ^{Sc} in CWD-affected moose	148
Figure 6. PrP ^{Sc} immunolabelling in CWD-affected moose Sw3 and No6 with different anti-PrP antibodies	149
Figure 7. Neuroanatomical distribution and profiles of PrP ^{Sc} in Swedish CWD-affected moose with L42 and SAF84 mAbs	150
Figure 8. Neuroanatomical distribution and profiles of PrP ^{Sc} in Norwegian CWD-affected moose with L42 and SAF84 mAbs.....	151
Figure 9. Comparison of the neuroanatomical distribution and profiles of PrP ^{Sc} in Norwegian CWD-affected moose (No6) versus Swedish CWD-affected moose (Sw3) with L42 and SAF84 mAbs	152
Figure 10. PrP ^{Sc} profiles in the brain of Finnish moose with CWD	153
Figure 11. Total PrP ^{Sc} content in the brains of in Swedish (Sw), Norwegian (No), and Finnish (Fi) moose with CWD	154
Supplementary figure 1. Immunolabelling of PrP ^{Sc} in moose and reindeer controls	165

Estudio 4

Figure 1. Electrode distribution on the sheep's head.....	175
Figure 2. Sleep-wake patterns	176
Figure 3. Sleep fragmentations.....	177
Figure 4. Alterations in NREM and REM sleep.....	179
Figure 5. Percentage of Delta frequencies in NREM sleep	180

Índice de tablas

Revisión bibliográfica

Tabla 1: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles animales y humanas. 15

Tabla 2: Diferentes genotipos de la combinación de los 5 haplotipos ovinos 52

Estudio 1

Tabla 1: Goat inocula with caprine BSE used in the bioassay..... 76

Tabla 2: Goat inocula with bovine BSE used in the bioassay..... 76

Tabla 3: Bioassay of goat tissues inoculated with caprine-BSE. Incubation period and positive rates 84

Tabla 4: Bioassay of goat tissues inoculated with bovine-BSE. Incubation period and positive rates..... 85

Estudio 2

Tabla 1: Genotypic and allelic frequencies for polymorphic sites of the horse *PRNP* gene 113

Tabla 2: Genotypic and allelic frequencies for polymorphisms c.525C>A and c.570G>A of the horse *PRNP* gene for breeds with a number of $N \geq 5$ 114

Tabla 3: Haplotype frequencies of 7 polymorphisms in the horse *PRNP* gene 116

Tabla 4: Impact assessment of the non-synonymous V2G and V182I polymorphisms using Polyphen-2, PROVEAN, PANTHER, Meta-SNP and PredictSNP..... 117

Tabla 5: Evaluation of the aggregation propensities of prion protein using AMYCO..... 120

Estudio 3

Tabla 1: Identification of the moose investigated 139

Tabla 2: OD values in the IDEXX ELISA test applied to different brain areas 155

Antecedentes y objetivos

Antecedentes y objetivos

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, de desenlace fatal, causadas por un cambio conformacional de la proteína prion celular (PrP^C), una glicoproteína que en los mamíferos está codificada de forma fisiológica por el gen *PRNP*, originando la forma patógena (PrP^{Sc}). Las enfermedades priónicas afectan tanto a humanos como a los animales domésticos y silvestres, y en total se han descrito dieciséis enfermedades distintas, siete en animales y nueve en los seres humanos (Imran & Mahmood, 2011b). En el caso de las enfermedades animales, destacan principalmente el scrapie ovino y caprino, la enfermedad crónica caquetizante (ECC) de los ciervos y la más relevante de todas, dado su potencial zoonótico, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB).

Los primeros registros históricos fiables sobre las EET datan del siglo XVIII, concretamente del año de 1732, en el que se describe el scrapie, conocido también como prurito lumbar ovino o tembladera (McGowan, 1922). No fue hasta dos siglos después, en 1936, cuando Cuillé y Chelle demostraron su transmisibilidad intraespecie (de oveja a oveja), al mismo tiempo que se constató el largo periodo de incubación necesario para la aparición de signos clínicos (Cuillé, 1936). En 1942 se describió el scrapie en la especie caprina (Chelle, 1942), y años más tarde la transmisión del scrapie a ratones (Chandler, 1961). Este último hecho, determinó que la investigación sobre este grupo de enfermedades avanzara considerablemente.

En el año 1986 se identificó una nueva EET en los animales, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB), diagnosticada en el ganado bovino británico que presentaba síntomas y lesiones neurológicas similares a los descritos en el scrapie. Por su repercusión en la salud pública, provocó una de las crisis alimentarias más importantes

Antecedentes y objetivos

de las últimas décadas en Europa. Tras los numerosos estudios realizados para intentar averiguar su origen, se llegó a la conclusión de que el factor común presente en las granjas afectadas era la utilización de piensos y suplementos alimenticios elaborados con harinas de carne y hueso de origen animal fabricadas a partir de restos de porcinos, vacunos, ovinos y aves (Wilesmith et al., 1988). A finales de la década de los años 80 la enfermedad ya era considerada un grave problema de sanidad animal, no obstante, su importancia cobró una enorme importancia tras su asociación como posible causa de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en la especie humana. En 1995, se describieron los primeros casos conocidos de esta variante (Bateman et al., 1995), un año después se diagnosticaron 10 casos más (Will et al., 1996) y posteriormente, en 1997, se demostró que esta variante estaba causada por la ingestión de productos bovinos infectados por la EEB (Bruce et al., 1997).

En el caso del scrapie, pese a que no hay evidencias directas de que suponga un riesgo para la salud humana (Detwiler & Baylis, 2003), recientemente se ha demostrado su capacidad de cruzar la barrera de transmisión humana en ratones transgénicos humanos (Cassard et al., 2014). La transmisión experimental por vía oral del agente de la EEB al ovino y caprino (Foster et al., 1993) y la detección de dos casos naturales de EEB en la especie caprina (Eloit et al., 2005; Spiropoulos et al., 2011) mostró que la transmisión de la EEB a pequeños rumiantes se puede producir de forma natural. La distribución en el sistema nervioso central (SNC) y en el sistema linforeticular (SLR) del agente de la EEB en la oveja (J. D. Foster et al., 1996), junto con la dificultad de distinguir clínica y/o anatomopatológicamente entre el scrapie y la EEB en la oveja, constituye un riesgo adicional de introducción del agente causal de la EEB en la cadena alimentaria.

Por esa razón, las principales medidas adoptadas para la vigilancia y control de la EEB se aplicaron también en el caso del scrapie.

Por todo ello, en el primer estudio de la tesis titulado **“*In vitro* detection of Caprine BSE in asymptomatic PrP humanized mice after inoculation with negative goat tissues”** se pretende determinar los mecanismos de transmisión de la EEB de origen caprino y bovino a ratones transgénicos que expresan la proteína prion celular humana.

Numerosas especies en las que nunca se ha observado una infección natural con EET, han sido infectadas de forma experimental (Barria et al., 2014; Cassard et al., 2014). Sin embargo, existen tres grupos de especies animales a las que se ha considerado históricamente como resistentes a las EET, estos son los cánidos, los lepóridos y los équidos (Khan et al., 2010). En el segundo estudio, titulado **“Novel polymorphisms in the prion protein gene (*PRNP*) and stability of the resultant prion protein in different horse breeds”** se han estudiado los polimorfismos del gen *PRNP* en 20 razas diferentes de la especie equina, intentando explicar y detectar posibles respuestas frente a tal resistencia.

Recientemente, ha adquirido una gran importancia a nivel mundial la enfermedad crónica caquetizante (ECC) en cérvidos. Hoy en día, la mayor prevalencia y alcance geográfico se encuentra en Norteamérica (Carlson et al., 2018; Miller & Williams, 2003; E. Williams, 2005), pero también se ha detectado en Corea del Sur (Lee et al., 2013) y se describió por primera vez en Europa en el año 2016, concretamente en Noruega (Benestad et al., 2016). Esta fue también la primera descripción de la ECC en renos y siendo las características bioquímicas e inmunohistoquímicas similares a las encontradas en los aislados norteamericanos. Este hecho ha tenido como consecuencia que las medidas de vigilancia europeas se hayan extendido a todos los cérvidos. El tercer

estudio titulado **“Heterogeneity of pathological prion protein accumulation in the brain of moose (*Alces alces*) from Norway, Sweden and Finland with chronic wasting disease”** se han valorado mediante la técnica inmunohistoquímica (IHC) en alces europeos afectados por la ECC y se han determinado los patrones inmunohistoquímicos de todos ellos.

Uno de los principales objetivos de los estudios en EET es intentar realizar diagnósticos precoces, ya que los signos clínicos no aparecen hasta que el daño nervioso está muy avanzando, impidiendo cualquier aproximación terapéutica. Es por ello que los estudios de biomarcadores en las EET tienen una gran relevancia. El cuarto estudio titulado **“Sleep disturbance in clinical and preclinical scrapie-infected sheep measured by polysomnography”** busca determinar las posibles alteraciones del sueño que causan las enfermedades priónicas y si es posible la utilización de la polisomnografía como herramienta diagnóstica.

El objetivo principal de esta tesis doctoral titulada: **“Estudio de los factores implicados en la transmisión, susceptibilidad genética y diagnóstico de las enfermedades priónicas”** es profundizar en el conocimiento de las EET o enfermedades priónicas. Esta tesis está organizada en cuatro estudios cuyos objetivos se detallan a continuación.

Estudio nº1: *In vitro* detection of Caprine BSE in asymptomatic PrP humanized mice after inoculation with negative goat tissues

- Objetivo general: Determinar el riesgo de exposición del ser humano a la EEB a través del consumo de productos cárnicos y lácteos caprinos potencialmente contaminados.
- Objetivos específicos:
 - Demostrar si, en animales infectados con EEB caprina y bovina de genotipos 222QQ y 222QK en los que no se ha podido detectar la PrP^{Sc} por métodos convencionales (inmunohistoquímica y western blot) en tejidos y fluidos, son en realidad infectivos.
 - Demostrar la resistencia del genotipo 222KK frente a la EEB bovina mediante pruebas de infectividad con los tejidos y fluidos más utilizados en la cadena alimentaria humana: músculo, tracto gastrointestinal, hígado, sangre y leche.

Estudio nº2: Novel polymorphisms in the prion protein gene (*PRNP*) and stability of the resultant prion protein in different horse breeds

- Objetivo general: Detectar posibles factores genéticos que determinan la resistencia o susceptibilidad a las enfermedades prionicas en caballos.
- Objetivos específicos:
 - Analizar la variabilidad de la región codificante del gen *PRNP* en caballos de 20 razas diferentes.
 - Evaluar "*in silico*" el efecto de los polimorfismos detectados mediante los programas informáticos Polyphen-2, PANTHER y PROVEAN.

Antecedentes y objetivos

- Evaluar la propensión al depósito de sustancia amiloide que provocan los polimorfismos detectados mediante el programa AMYCO.
- Modelado 3D de la estructura de la proteína PrP^c del caballo mediante el software Swiss-PdbViewer para evaluar las variaciones en los puentes de hidrógeno y potenciales electrostáticos que se producen dependiendo de los polimorfismos encontrados.

Estudio nº3: Heterogeneity of pathological prion protein accumulation in the brain of moose (*Alces alces*) from Norway, Sweden and Finland with chronic wasting disease

- Objetivo general: Obtener una mejor comprensión de la presentación neuropatológica y la localización de PrP^{CWD} en el encéfalo de la enfermedad crónica caquetizante en los alces diagnosticados en Noruega, Suecia y Finlandia e identificar las similitudes y variaciones entre los casos.
- Objetivos específicos:
 - Analizar semicuantitativamente el depósito de PrP^{CWD} en el encéfalo de 7 alces noruegos, 4 alces suecos y 2 alces finlandeses mediante la técnica de inmunohistoquímica.
 - Analizar los patrones de depósito de PrP^{CWD} mediante inmunohistoquímica que presentan los alces con 5 anticuerpos diferentes y comparar con los patrones obtenidos en la enfermedad crónica caquetizante en Norte América y Noruega.
 - Analizar las diferentes zonas encefálicas y localizar el depósito de PrP^{CWD} mediante inmunohistoquímica y ELISA en 7 siete áreas

Antecedentes y objetivos

cerebrales diferentes: corteza frontal, corteza temporal, corteza occipital, tálamo, mesencéfalo, obex y cerebelo.

Estudio nº4: Sleep disturbance in clinical and preclinical scrapie-infected sheep measured by polysomnography

- Objetivo general: Comprender la relación entre la patología del sueño y las enfermedades priónicas y a su vez detectar el papel que puede tener la PrP^C en uno de los procesos más esenciales para la vida: el ciclo sueño/vigilia.
- Objetivos específicos:
 - Identificar y establecer mediante electroencefalografía, electromiografía y electrooculografía la duración cuantitativa de los estados de sueño y vigilia durante el ciclo circadiano en la especie ovina.
 - Identificar las posibles alteraciones conductuales del sueño que produce una enfermedad priónica como es el scrapie en el modelo ovino.
 - Identificar e interpretar alteraciones del sueño en ovejas en estadio preclínico de la enfermedad de scrapie.
 - Identificar tratamientos paliativos del insomnio en ovejas afectadas con scrapie y extrapolar los resultados a enfermedades neurodegenerativas humanas.

Revisión bibliográfica

INTRODUCCIÓN

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) son enfermedades neurodegenerativas progresivas y mortales que afectan tanto a animales como a seres humanos. Dentro de este grupo de enfermedades se incluyen el scrapie en pequeños rumiantes, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en la especie bovina, la enfermedad crónica caquetizante en cérvidos y alces (ECC) y las que afectan a humanos como la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) y el Kuru.

Las EET se caracterizan por sus largos periodos de incubación (de meses a años), su curso clínico progresivo y por una gliosis, el depósito de la proteína prion patológica y una degeneración espongiforme del SNC acompañada por una vacuolización tanto intraneuronal como en el neuropilo y como consecuencia se produce la muerte neuronal y finalmente acaba con la vida del individuo (Bell & Ironside, 1993; Fraser, 1993). Los síntomas son principalmente neurológicos destacando los cambios de comportamiento, disfunción motora, deterioro cognitivo y ataxia cerebral. Estos cambios neuropatológicos se presentan con especial frecuencia en determinadas áreas y núcleos nerviosos.

Las EET están causadas por la conversión de la proteína prion celular (PrP^C), glicoproteína fisiológica del organismo, en una isoforma mal plegada y agregada denominada proteína prion patológica (PrP^{Sc}). Se trata de una proteína que presenta una resistencia parcial a la digestión con proteasas, insolubilidad en detergentes no iónicos y gran resistencia a los procesos de esterilización, tanto físicos como químicos,

así como una tendencia a formar agregados (Prusiner, 1982, 1998). La susceptibilidad y su patogenia están moduladas principalmente por el gen *PRNP* (K Basler et al., 1986).

A pesar de que el Kuru fue descrito por primera vez en 1920 y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en el año 1957, las EET adquirieron una mayor importancia en la década de 1980 en el Reino Unido con la asociación de la EEB en el ganado vacuno y la variante de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob en humana debido al consumo de productos de origen vacuno contaminada con la proteína prion patológica.

Desde entonces, el número de EET identificadas ha ido aumentando, por lo que hoy en día se conocen dieciséis enfermedades diferentes incluidas en este grupo: nueve en los seres humanos y siete en animales, todos ellos mamíferos (Imran & Mahmood, 2011b). Así según su origen, las EET se clasifican en (Imran & Mahmood, 2011b):

- Esporádicas o espontáneas: Son aquellas en las que no se ha demostrado una causa aparente. Sin embargo, son las más frecuentes en la especie humana ya que en torno al 85% de los casos diagnosticados en el ser humano son de origen esporádico (Ladogana et al., 2005). Unos ejemplos de ello son, el insomnio fatal esporádico y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica.
- Hereditarias, genéticas o familiares: Se deben a una mutación en el gen *PRNP*; ejemplos de este tipo son la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker y el insomnio familiar fatal.
- Adquiridas: Son producidas por infección con el agente causal, como es el caso del Kuru, de la variante de la ECJ en humanos y de la mayoría de las EET animales.
- Iatrogénicas: Se transmiten en procedimientos médicos quirúrgicos por medio de material contaminado, como en el caso de ECJ iatrogénica

Tabla 1: Encefalopatías Espongiformes Transmisibles animales y humanas.

Animales			
Enfermedad	Hospedador	Etiología	Año de descripción
Scrapie	Ovino y caprino	Infeccioso	1972
Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB)	Bovino	Infeccioso	1986
Enfermedad crónica caquetizante (ECC)	Cévidos	Infeccioso	1998
Encefalopatía Espongiforme felina (EEF)	Felinos	Infeccioso	1990
Encefalopatía transmisible del visón (ETV)	Visón	Infeccioso	1947
Encefalopatía de ungulados exóticos (EUE)	Antílope	Infeccioso	1986
EET en primates no humanos	Lémur	Infeccioso	1996
Humanas			
Enfermedad	Hospedador	Origen	Año de descripción
Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (iECJ)	Ser humano	Infeccioso	1974
Creutzfeldt-Jakob esporádico (sECJ)	Ser humano	Espontáneo	1920
Creutzfeldt-Jakob familiar (fECJ)	Ser humano	Hereditario	1924
Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)	Ser humano	Infeccioso	1996
Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Ser humano	Hereditario	1936
Insomnio familiar fatal (IFF)	Ser humano	Hereditario	1986
Insomnio esporádico fatal (IEF)	Ser humano	Espontáneo	1999
Kuru	Ser humano	Canibalismo	1900
Prionopatía variable sensible a la proteasa (PVSPr)	Ser humano	Espontáneo	2008

ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN ANIMALES

Scrapie

Los primeros registros históricos fiables sobre las EET datan del siglo XVIII, concretamente del año de 1732, en el que se describe el scrapie, conocido también como prurito lumbar ovino o tembladera debido a su sintomatología (Cuillé & Chelle, 1938). Esta enfermedad, afecta de forma natural tanto a ovejas como a cabras y muflones (Jeffrey & Gonzalez, 2007), y se caracteriza por una ataxia crónica progresiva que puede llegar a impedir a los animales sostenerse en pie, además de causar un prurito intenso, incoordinación de movimientos y cambios en el comportamiento (Liberski, 2012). En 1938 se demostró que esta enfermedad era producida por un agente infeccioso tras los experimentos de Cuillé y Chelle, que comprobaron su transmisibilidad al inocular ovejas sanas con extractos de cerebro y homogeneizados de médula espinal de animales enfermos (Cuillé, 1938). En 1942 también se describió en la especie caprina (Chelle, 1942) y más tarde, en 1957, Hadlow relacionó el scrapie con una enfermedad endémica rara detectada en tribus de Nueva Guinea, el Kuru (Hadlow, 1995).

El scrapie adquirió una mayor importancia en la década de los 80 debido a la asociación del scrapie como posible origen de la EEB, como consecuencia del consumo de piensos elaborados con harinas de carne y huesos de animales infectados con scrapie (Wilesmith et al., 1988).

Tradicionalmente, el scrapie no se ha considerado como una zoonosis (Chatelain et al., 1981), pero recientemente se ha demostrado mediante modelos experimentales

la capacidad de algunos agentes priónicos de cruzar la barrera de transmisión humana en ratones transgénicos que expresan la PrP^C humana (Cassard et al., 2014). Estos hechos junto con anteriores estudios en los que se detectaron priones en músculo esquelético (Andreoletti et al., 2004; Garza et al., 2014), suponen la necesidad de nuevos estudios para poder valorar cual es el riesgo real para salud pública.

Encefalopatía espongiforme bovina

La encefalopatía espongiforme bovina también conocida como “enfermedad de las vacas locas”, se diagnosticó por primera vez en 1986 en Reino Unido (Wells et al., 1987). Poco tiempo después se extendió y se convirtió en epidemia. Los animales infectados por la EEB presentan períodos de incubación de entre 4 o 5 años y signos clínicos similares a los observados en la especie ovina por el scrapie, incluyendo caquexia, alopecia, aprensión, comportamiento letárgico o agresivo, hipersensibilidad a los estímulos y anomalías en el movimiento (Konold et al., 2006). Por todo ello, fue considerada como una nueva enfermedad denominada encefalopatía espongiforme bovina.

Se han formulado varias hipótesis sobre el origen de la EEB, pero la más aceptada ha sido la práctica de alimentar al ganado con harinas de carne y hueso contaminadas con priones infecciosos (Wilesmith et al., 1991). Todo ello supuso la implantación de una serie de medidas por los diferentes países y por la propia Comisión Europea, para romper el ciclo de transmisión de esta enfermedad y con ello disminuir las infecciones. Gracias a ello, se consiguió reducir drásticamente la incidencia de la enfermedad, aunque todavía no se ha erradicado por completo.

Histopatológicamente se caracteriza por una vacuolización que se observa predominantemente en la médula oblongada a nivel del obex (Jeffrey & Gonzalez, 2004) y también en la sustancia gris central, el colículo rostral y el hipotálamo (Ganley et al., 2015; Simmons et al., 1996; Wells et al., 2005).

La presencia de la proteína prion infecciosa (PrP^{Sc}) en los animales infectados por la EEB, a diferencia del scrapie, se limita principalmente al sistema nervioso. Sin embargo, se ha descrito una baja infectividad en intestino delgado (placas de peyer), íleon distal, yeyuno (Hoffmann et al., 2011) y amígdalas (Buschmann & Groschup, 2005; Espinosa et al., 2007; Hoffmann et al., 2011; Stack et al., 2011; Terry et al., 2003; Wells et al., 2005). Además, recientemente, se ha detectado infectividad en los músculos esqueléticos (Okada et al., 2014) debido a la propagación centrífuga del agente por los nervios a través de las vías motoras y/o sensitivas hasta los tejidos musculares. Por todo ello, fue importante definir los materiales específicos de riesgo para evitar la entrada de materiales contaminado por EEB en la cadena alimentaria.

Esta enfermedad ha demostrado una gran capacidad para transmitirse a otras especies (Bruce et al., 1994). Durante los años 80, se extendió a los humanos con la aparición de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Bruce et al., 1997). Además, se detectó en gatos y animales de zoológico, y dio lugar a la encefalopatía espongiiforme felina (EEF), la encefalopatía espongiiforme de ungulados exóticos (EUE) y la encefalopatía espongiiforme en primates no humanos (NHP) (Sigurdson & Miller, 2003). Posteriormente, en el año 2005 se detectó en Francia el primer caso de EEB natural en cabras (Eloit et al., 2005), que se repetía un año después en el Reino Unido (Jeffrey et al., 2006). Estos estudios sugirieron que la EEB caprina

podría suponer un riesgo potencial para la salud humana, lo que implicaría introducir unas mejoras necesarias en las estrategias de control.

En el año 2004 se detectaron dos nuevos fenotipos neuropatológicos y moleculares de la EEB, que se clasificaron dependiendo de sus características bioquímicas y biológicas en dos grupos: tipo H (Biacabe et al., 2004) y tipo L (Casalone et al., 2004). A día de hoy, poco se sabe sobre estas nuevas variantes. Varios estudios demostraron que la EEB tipo H no se podía transmitir a ratones transgénicos que expresan la PrP^C humana (Beringue et al., 2008; Wilson et al., 2012). En el año 2008 se demostró que la EEB de tipo L puede propagarse en ratones transgénicos humanizados que sobreexpresan el aminoácido metionina en el codón 129 con mayores tasas de infección que la EEB clásica epidémica (Beringue et al., 2008) y por ello podría suponer un potencial riesgo zoonótico (Ono et al., 2011).

Enfermedad crónica caquetizante (ECC)

La enfermedad crónica caquetizante (ECC) es una EET natural que afecta a los cérvidos tanto de granja como de vida libre. Se detectó por primera vez en el año 1967 en un ciervo mula cautivo en EEUU en el estado de Colorado y fue diagnosticada años después en 1978 (Williams & Young, 1980). Es una enfermedad muy común en Norteamérica y afecta a diferentes especies de cérvidos como el ciervo mula (*Odocoileus hemionus*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el alce de las montañas rocosas (*Cervus canadensis nelsoni*) y el alce (*Alces alces*). Esta enfermedad también se ha detectado en Corea del Sur en ciervo rojo (*Cervus nippon*) (Lee et al., 2013). En 2016 se detectó por primera vez en el continente europeo, en Noruega, el primer caso de ECC

en Europa en renos de vida silvestre (Benestad et al., 2016), por lo que actualmente se considera una enfermedad emergente y de importancia creciente en el continente.

Sus principales síntomas son una marcada pérdida de peso, pelaje áspero y seco, salivación excesiva, movimientos anormales de extremidades, muerte súbita tras la manipulación, cabeza baja con orejas caídas y cambios de comportamiento como la pérdida de miedo a los humanos. El tiempo de supervivencia oscila entre siete y ocho meses en los ciervos (Williams & Young, 1980), pero puede ser mayor en los alces (Miller et al., 1998) aunque también pueden ser semanas dependiendo de los individuos (Benestad et al., 2016).

Se desconoce si la ECC surge de forma espontánea o se transmite desde otras especies. El scrapie podría ser un posible origen, ya que la inoculación intracerebral de alces con este agente ha inducido rasgos de ECC (Hamir et al., 2004). Aunque la vía de infección más probable es la transmisión horizontal. Puede transmitirse eficazmente por contacto con animales afectados, ya que los priones de la ECC se segregan y excretan por la orina, las heces, la saliva y la sangre, o a través de la exposición ambiental a pastos, suelo y agua contaminados por la ECC (Almberg et al., 2011; Kuznetsova et al., 2014). Por ello, en países como EE.UU. y Canadá se han aplicado medidas de vigilancia y control para intentar reducir la propagación de la enfermedad, mitigar las pérdidas económicas debidas a la disminución de la caza recreativa y controlar la posible transmisión entre especies (E. S. Williams, 2005).

Numerosos experimentos han demostrado que la ECC no puede cruzar la barrera de especie por vía oral (Sigurdson, 2008; Sigurdson & Miller, 2003; Tamguney et al., 2006; Wilson et al., 2012). No obstante, si se inocula por vía intracerebral, se ha

observado que puede ser transmisible al ganado vacuno, ovino y caprino, así como a hurones, hámsteres, topillos, visones, mapaches y monos ardilla (Sigurdson, 2008). A pesar de los numerosos estudios realizados no hay pruebas epidemiológicas hasta la fecha del comportamiento zoonótico del agente de la ECC.

Recientemente, se ha demostrado la existencia de diferentes cepas de ECC en Europa. Se ha detectado ECC en otros cinco alces en Noruega (Pirisinu et al., 2018), tres alces en Suecia (Agren et al., 2021) y dos alces en Finlandia (Tranulis et al., 2021). Éstos mostraron fenotipos moleculares e inmunohistoquímicos totalmente diferentes a los descritos previamente en la ECC clásica de Norteamérica (Pirisinu et al., 2018). Mediante un estudio en ratones transgénicos se observaron las características neuropatológicas y bioquímicas de la ECC de los alces noruegos en comparación con los aislados estadounidenses, observando resultados similares a los obtenidos en 2018 y demostrando que existen diferentes cepas de ECC (Nonno et al., 2020).

ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES EN HUMANOS

Las EET humanas se clasifican en función de su origen en: familiares, que son genéticas, esporádicas e infecciosas o adquiridas.

Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos: Genéticas

Las enfermedades priónicas genéticas o familiares están producidas por mutaciones autosómicas dominantes del gen *PRNP*. Destacan principalmente la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fECJ), el insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

1. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fECJ)

La ECJ familiar o genética se detectó por primera vez en Alemania en una familia que portaba la mutación D178N (Kretschmar et al., 1995). Años más tarde, se demostró su transmisibilidad genética (Gibbs et al., 1968). Esta enfermedad se debe a mutaciones puntuales del gen *PRNP*, siendo la más frecuente la E200K (Gambetti et al., 2003).

2. Insomnio familiar fatal (IFF)

El nombre de insomnio familiar fatal (IFF) fue utilizado por primera vez en 1986 por Lugaresi y colaboradores para describir un caso de 52 años que presentaba insomnio progresivo y disfunción autonómica, seguido de disartria, temblores y mioclonías. Las dos hermanas del paciente y muchos otros parientes durante tres generaciones habían muerto a consecuencia de una enfermedad similar (Lugaresi et al., 1986). Su principal característica clínica es la "epónima", que se define como un sueño

gravemente perturbado, caracterizado por insomnio resistente a los ansiolíticos, disfunción del ritmo circadiano, fragmentación del sueño y excitación. Está asociado a la mutación en el codón 178 del gen *PRNP* (Gambetti et al., 2003).

3. Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)

El GSS, una enfermedad familiar con herencia autosómica dominante, fue descrita por primera vez en 1936 por Gerstmann, Sträussler y Scheinker (Richardson & Masters, 1995). Las primeras etapas de esta enfermedad se caracterizan principalmente por una ataxia cerebelosa progresiva (Collins et al., 2001). Esta enfermedad está causada por una mutación en el codón 102 del gen *PRNP* descrita por primera vez en 1995 (Kretzschmar et al., 1995). La neuropatología del GSS se caracteriza por el depósito de placa amiloide en la corteza cerebral, ganglios basales y corteza cerebelosa, acompañado de astrogliosis, pérdida neuronal y depósitos de la proteína tau (Gambetti et al., 2003).

Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos: Esporádicas

1. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sECJ)

La sECJ es la forma predominante de la enfermedad, ya que representa en torno al 85% de los casos totales de ECJ (Masters et al., 1979) y se caracteriza por una demencia rápidamente progresiva con una duración de menos de 12 meses en un alto porcentaje de los casos. Los fenotipos clinicopatológicos y moleculares de la sECJ están influenciados por las mutaciones en el gen *PRNP*. Es por ello que los homocigotos metionina en el codón 129 representan aproximadamente el 70% de todos los casos de sECJ (Kovacs & Budka, 2009).

Encefalopatías espongiformes transmisibles en humanos: Infecciosas

1. Kuru

El Kuru es un trastorno neurológico endémico observado por vez primera en los miembros de unas tribus de Papúa Nueva Guinea (Zigas & Gajdusek, 1957). Su nombre deriva de la palabra “Kuru” que significa “temblar” ya que era el cuadro clínico mayoritario que presentaban los pacientes. Esta enfermedad rápidamente se vinculó con el canibalismo, lo que llevó a las autoridades a mediados de los años 50 a prohibir esta práctica. Esto supuso que la incidencia de la enfermedad comenzara a disminuir drásticamente (Alpers, 2008).

2. Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iECJ)

La enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (iECJ) es el resultado de la exposición accidental a priones durante procedimientos médicos y quirúrgicos debido a esterilizaciones insuficientes o al uso de material biológico contaminado. Los signos clínicos son similares a los de la sECJ, aunque en algunos casos debidos a tratamiento hormonal puede predominar la sintomatología cerebelosa (Brown et al., 1992; Glatzel et al., 2005; Kovacs & Budka, 2009).

3. Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)

Fue en el año 1996 cuando notificaron los primeros casos de esta enfermedad (Will et al., 1996). Gracias a estudios epidemiológicos, junto con la transmisión experimental de la enfermedad a ratones y la tipificación bioquímica de las cepas, consiguieron relacionar la etiología de la vECJ con la exposición a productos alimentarios de origen bovino infectados por la EEB (Bruce et al., 1997; Hill et al., 1997; Imran & Mahmood,

2011b). Como en otras enfermedades priónicas el polimorfismo Metionina/Valina en el codón 129 del gen *PRNP* tiene una gran importancia, ya que todos los casos descritos, excepto uno, eran homocigotos metionina en el mismo (Kaski et al., 2009; Kovacs & Budka, 2009). La principal característica neuropatológica de la vECJ es la presencia de un gran número de placas floridas en la corteza cerebral y la corteza cerebelosa, compuestas por un núcleo amiloide eosinófilo central con fibrillas amiloides lineales radiantes rodeadas por una corona esponjiforme (Will et al., 1996). El tálamo también muestra una pérdida neuronal severa así como gliosis (Collie et al., 2003). Mediante la técnica de inmunohistoquímica, la proteína priónica muestra un marcado intenso de las placas floridas en la corteza cerebral y cerebelosa junto a pequeños depósitos amorfos "plumosos" de PrP^{Sc} (Figura 1) (Ironsides & Head, 2008).

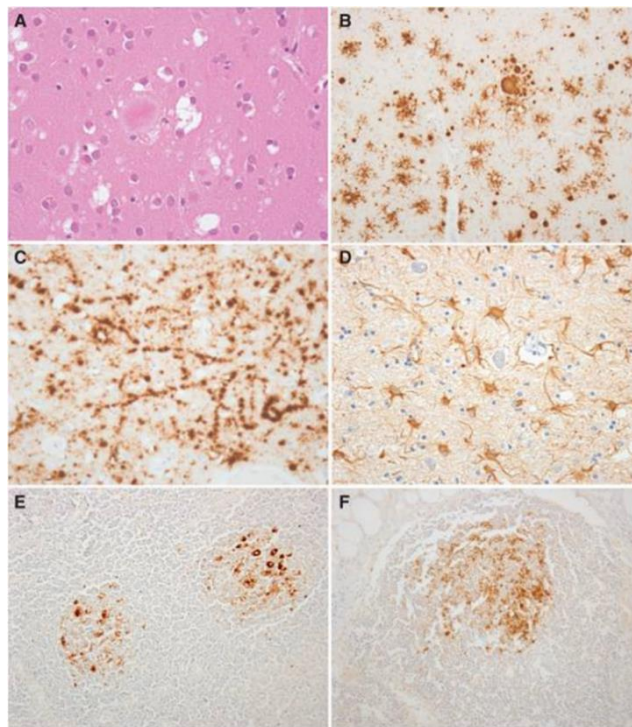


Figura 1. Hallazgos neuropatológicos característicos de las EET. A) Placas floridas con un núcleo central de sustancia amiloide rodeadas por vacuolas en la corteza frontal. B) Presencia de PrP^{Sc} rodeando las placas floridas. C) Presencia de PrP^{Sc} en ganglios basales con un patrón periaxonal lineal. D) Pérdida neuronal y gliosis en tálamo. E) La PrP^{Sc} dentro de las células dendríticas foliculares. F) Presencia de PrP^{Sc} en células dendríticas foliculares de linfonodo cervical (Will & Ironsides, 2017).

ETIOLOGÍA

La etiología de las enfermedades priónicas ha sido una cuestión controvertida durante muchas décadas, ya que se han propuesto numerosas teorías acerca de la naturaleza del agente causal. En un principio se pensó que el agente causal del scrapie era un parásito con sintomatología muscular (M'Fadyean, 1918). Posteriormente, se consideró que podría tratarse de un lentivirus, ya que el material procedente de los animales enfermos conservaba su carácter infectivo y poseía un periodo de incubación muy largo. En 1966, la doctora Tikvah Alper y colaboradores descubrieron que el tamaño del agente infeccioso responsable del scrapie era muy pequeño (Alper et al., 1966) , un año más tarde observaron que este agente causal era resistente a las radiaciones ultravioletas y a la radiación ionizante, acabando así con el denominado “Dogma central de la biología”, según el cual, una enfermedad o infección sólo podía expandirse por replicación de material genético de un virus o una bacteria. Alper demostró que el agente del scrapie no tenía ni ARN ni ADN y que por lo tanto no era ni un virus ni una bacteria (Alper et al., 1967). Ese mismo año se propuso que podría tratarse de una proteína de bajo peso molecular (Pattison & Jones, 1967), pero fue Griffith el que con todas esas ideas propuso diferentes mecanismos para explicar la autoreplicación de la proteína. El más ampliamente aceptado es el modelo de “nucleación-polimerización”, en el cual se basa la técnica de la amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (*protein misfolding cyclic amplification*, PMCA) (Griffith, 1967). En 1981, se detectaron unas estructuras filamentosas de longitud variable en el encéfalo de animales con scrapie y en enfermos de ECJ. A estas estructuras las denominaron fibras asociadas a scrapie (SAF) (Merz et al., 1981).

No fue hasta el 1982 cuando Stanley B. Prusiner recopiló todas las evidencias experimentales citadas y denominó a esta partícula proteínica infecciosa capaz de autoreplicarse, prion (Prusiner, 1982). Propuso que esta proteína llamada prion era el agente causal de las EET, las cuales, estaban causadas por un cambio conformacional en la estructura terciaria de la proteína prion celular (PrP^C), a proteína prion patológica (PrP^{Sc}). Basándose en las propiedades físico-químicas, observaron que dicha proteína era parcialmente resistente frente a la proteinasa K y poseía un tamaño de 27-30 Kda, por lo que se la denominó PrP^{res} o PrP 27-30 (Prusiner et al., 1982).

La purificación de la PrP^{Sc} permitió descubrir que esta proteína no era el producto de un gen viral sino que era codificada por un gen del hospedador, el gen *PRNP* (Oesch et al., 1985). El descubrimiento de este gen supuso la detección de una proteína de unos 33-35 kDa, que se denominó proteína príon celular o PrP^C (K. Basler et al., 1986). Estos estudios confirmaron que un único gen codificaba tanto la proteína celular como la patológica. Numerosos estudios han demostrado que los priones generados *in vitro* son capaces de generar una EET, lo cual respalda la teoría de la proteína única (Castilla et al., 2005; Legname et al., 2004).

Proteína prion celular (PrP^C)

La PrP^C es una glicoproteína de unos 230-250 aminoácidos dependiendo de la especie animal y un peso molecular de 33-35 KDa. Está localizada principalmente en la membrana extracelular, a la que se une a través de la fracción glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Criado et al., 2005; Martins & Brentani, 2002). Esta codificada por el gen *PRNP*, que consta de una secuencia genética bastante conservada en los vertebrados. Esta glicoproteína consta de unas regiones bien diferenciadas:

- El extremo aminoterminal (N-terminal) formado por cinco repeticiones de un octapéptido (PHGGGWGQ).
- Un extremo carboxiterminal (C-terminal) formado por dos láminas- β cortas, y tres hélices α de dos hebras antiparalelas de cuatro aminoácidos cada una. Además consta de un puente disulfuro entre C179 y C214 y de dos sitio de N-glicosilación en los residuos N182 y N197 los cuales dan lugar a tres glicofomas: la forma no-glicosilada, la monoglicosilada y la diglicosilada (Caughey et al., 1989; Monari et al., 1994).
- Una región hidrofóbica muy conservada entre las diferentes especies (entre los residuos 112-145) que conecta los dominios N- y C- terminal.

La PrP^C se expresa predominantemente en las neuronas y en las células de la glía del SNC (Adle-Biassette et al., 2006). En consecuencia, los niveles de PrP^C en el sistema nervioso periférico (SNP) también son elevados especialmente en los ganglios sensitivos de la medula espinal (Ganley et al., 2015; Peralta et al., 2012; Tremblay et al., 2007). A pesar de todo, es omnipresente en todas las células del organismo de mamíferos (Moore et al., 2009). Cabe destacar su presencia en el SLR, en linfocitos y células dendríticas foliculares (Aguzzi & Heikenwalder, 2006) además de en otros órganos como pulmón, músculo esquelético, corazón, útero, timo, lengua, páncreas, bazo y amígdalas (Moudjou et al., 2001). Esta distribución generalizada de PrP^C aparentemente funcional, junto con su naturaleza altamente conservada, sugiere que tiene un rol o múltiples roles importantes en el organismo.

Mediante estudios *in vitro* y análisis fenotípicos de ratones *Knock-out* para la PrP^C, se ha observado que la PrP^C tiene una gran implicación en diversos procesos

fisiológicos que todavía no se conocen en su totalidad (Linden et al., 2008). De hecho, ha observado su implicación en:

- Modulación de la respuesta inmune mediante la activación de linfocitos T y monocitos (Castle & Gill, 2017).
- Protección frente a la apoptosis y al estrés oxidativo. (Kim et al., 2004; Roucou et al., 2004) .
- Diferenciación y proliferación celular (Steele et al., 2006).
- Protección frente a la neurodegeneración mediante la regulación de los niveles de proteína tau y β -amiloide (A β) (Castle & Gill, 2017; Linden, 2017; Mabbott, 2017).
- Actúa como receptor celular de Cu²⁺, asignándole un papel activo en la homeostasis de este catión implicado en procesos de óxido reducción (Brown et al., 1997; Kovacs & Budka, 2008).
- Regulación de la autofagia (Shin et al., 2013).
- Mantenimiento de mielina, homeostasis mitocondrial y transducción de señales (Castle & Gill, 2017).
- Participa en otros procesos, como la memoria a largo plazo, la renovación de células madre y la respuesta oxidativa celular (Zhang & Kaufman, 2006).
- Modulación de los ritmos circadianos (da Luz et al., 2015; Tobler et al., 1996) y procesos fisiológicos del sueño (Martins & Brentani, 2002), lo que sugiere que la PrP^C tiene un papel importante en uno de los procesos más esenciales para la vida: el sueño/ vigilia.

Proteína prion patológica (PrP^{Sc})

Como se ha comentado anteriormente, la PrP^{Sc} difiere de la PrP^C en su estructura secundaria ya que presentan los mismos aminoácidos (Prusiner, 1991). La estructura de la PrP^{Sc} todavía sigue siendo una gran desconocida. Hoy en día, los dos modelos más aceptados en cuanto a la estructura real de la PrP^{Sc} son el modelo de lámina β intermolecular paralela en registro (“Parallel In Register Intermolecular β -Sheet” o PIRIBS) (Grovetman et al., 2014) y el modelo de β -solenoides de cuatro escalones (“4-rung β -solenoid”) (Silva et al., 2015). El posicionamiento de cada monómero de PrP^{Sc} dentro de la fibra y como interacciona con los monómeros adyacentes además de la disposición de las láminas β , son las principales diferencias de estos dos modelos. Sin embargo, ambos señalan que la PrP^{Sc} está compuesta únicamente por láminas β , giros y lazos, en contraposición de anteriores modelos que estipulaban que la PrP^{Sc} estaba compuesta por solo un 43% de lámina β y por un 30% de estructura en α -hélice (Pan et al., 1993). Pese a que estos dos modelos se basaban en predicciones teóricas basadas en modelos moleculares, recientemente algunos estudios muestran fotografías de cepas de PrP^{Sc} realizadas mediante criomicroscopía electrónica que respaldarían mediante evidencia empírica la propuesta del modelo PIRIBS (Figura 2) (Hoyt et al., 2022; Kraus et al., 2021; Manka et al., 2022).

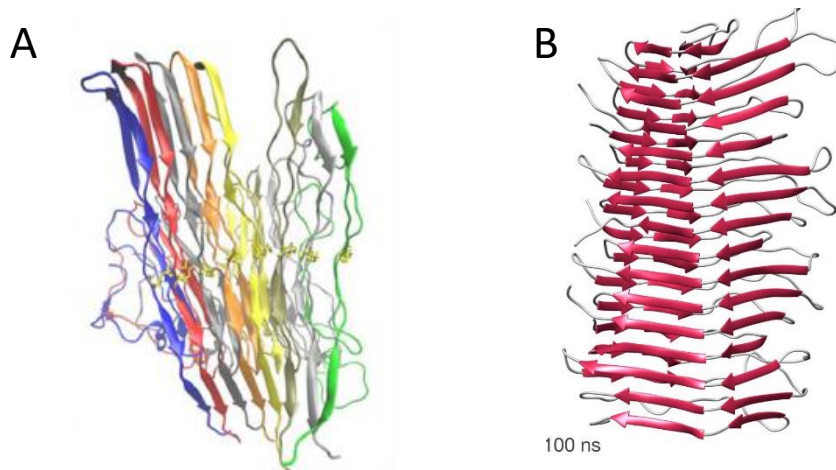


Figura 2. Estructura secundaria de la PrP^C y PrP^{Sc}. **A)** Modelo PIRIBS (parallel in-register intermolecular beta-sheet). **B)** Modelo de β -solenoides de cuatro escalones (4-rung β -solenoid). Adaptación de (Grovesman et al., 2014; Spagnoli et al., 2020).

Este cambio conformacional le otorga a la PrP^{Sc} grandes cambios en las propiedades fisico-químicas de la proteína: tendencia a la agregación, insolubilidad a detergentes no iónicos y resistencia parcial a la digestión con proteasas, dando lugar a la isoforma PrP²⁷⁻³⁰, con un tamaño de 27-30 KDa (Prusiner et al., 1982). Además, presenta unas características especiales como resistencia a procesos de esterilización químicos y físicos.

Mecanismo de conversión PrP^C a PrP^{Sc}

La presencia de PrP^C en el organismo es un requisito imprescindible para el desarrollo de las enfermedades priónicas. Esto se demostró en ratones transgénicos que no expresan la PrP^C que fueron infectados con PrP^{Sc} y no desarrollaron enfermedad. De la misma manera, se les trasplantó tejido neuronal normal provisto de PrP^C y la enfermedad se desarrolló únicamente en este tejido (Bueler et al., 1993). Además, en ratones heterocigotos con un solo alelo funcional para PrP^C se desarrolla la enfermedad,

pero con un período de incubación muy prolongado y unas manifestaciones clínicas mucho más tardías, lo que hace pensar que la disponibilidad de PrP^C por parte de la PrP^{Sc} es necesaria para su acumulación (Bueler et al., 1993). Así, una sobreexpresión de PrP^C hace que el período de incubación se acorte, apoyando la hipótesis anterior (Bueler et al., 1993). En estudios posteriores realizados mediante la técnica de la PMCA se ha demostrado que es imprescindible la presencia de la PrP^C para la replicación de la PrP^{Sc} (Castilla et al., 2005). A partir de todo ello, se propusieron dos hipótesis para explicar la replicación de la PrP^{Sc}:

- Modelo de plegamiento asistido por molde: Esta primera hipótesis fue presentada por Prusiner y su grupo de investigación en el año 1998 y propone que la PrP^{Sc} actúa como un molde para que la PrP^C se convierta en PrP^{Sc}. Destaca la presencia de un estado conformacional alternativo de la PrP^C que es la PrP*, que se considera un estado intermedio entre ambas. Este estado conformacional alternativo (PrP*) se forma a partir de la unión entre la PrP^C y un factor todavía no descubierto al cual se denomina como "Proteína X". Este proceso de replicación se produce mientras exista PrP^C en el medio que actúe como sustrato. Al continuar el proceso se formarían agregados de amiloide de PrP (Prusiner, 1998).
- Modelo de nucleación sembrada: Esta hipótesis establece que la PrP^C y la PrP^{Sc} se encuentran en un estado de equilibrio termodinámico que en condiciones fisiológicas está desplazado hacia la PrP^C. Según este último modelo, se formaría un núcleo o semilla a partir de varias moléculas de PrP^{Sc} al cual se irían uniendo cada vez más moléculas de PrP^{Sc} para dar lugar a agregados altamente

ordenados de fibra de amiloide, los cuales serían capaces de inducir un cambio masivo de las moléculas de PrP^C. Posteriormente, esta fibra de amiloide, se fragmentaría y daría lugar a nuevos núcleos o semillas que continuarían el proceso de forma exponencial. (Glatzel & Aguzzi, 2001; Jarrett & Lansbury, 1993). Con todo ello, se desarrolló la técnica de la amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (*protein misfolding cyclic amplification*, PMCA) basada en esta hipótesis. Se usa un sustrato, en este caso homogeneizado de encéfalo no infectado, en el cual se introduce pequeñas cantidades de PrP^{Sc}. Se va produciendo una conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} y se van formando agregados, que posteriormente son fragmentados mediante un proceso de sonicación en pequeños fragmentos que funcionan como semillas infecciosas y así forman nuevos agregados (Figura 3) (Castilla et al., 2005).

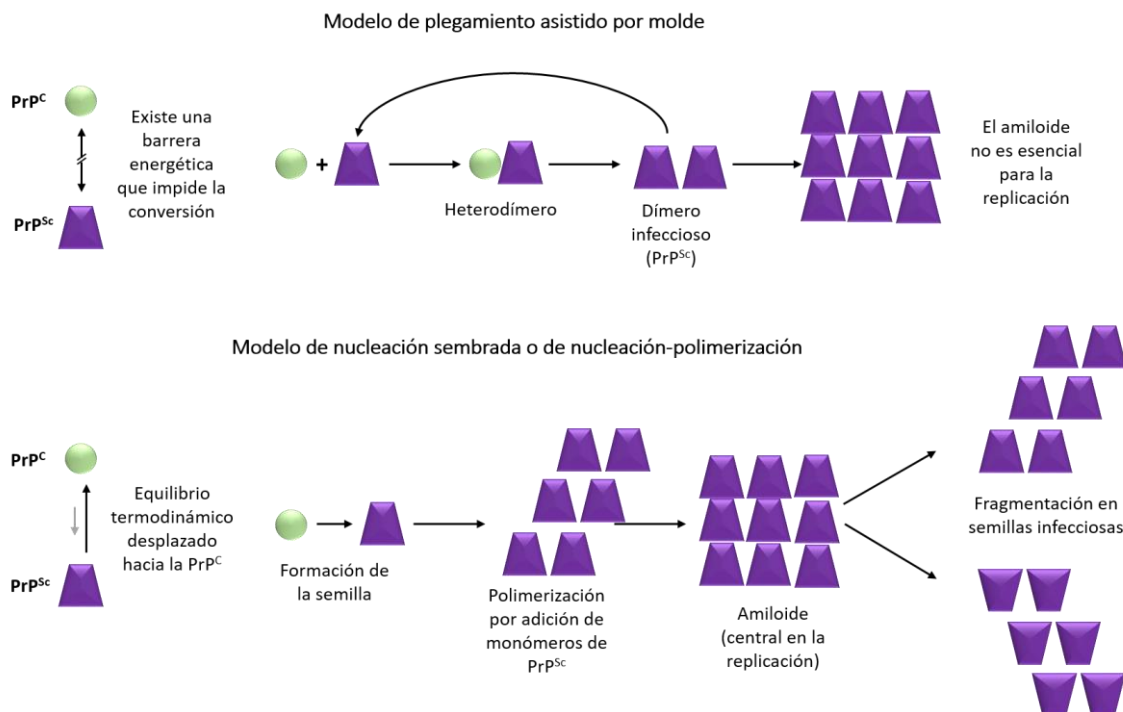


Figura 3. Modelos de replicación de los priones. A) Modelo de plegamiento asistido por molde. B) Modelo de nucleación sembrada. Adaptado de: (Aguzzi & Calella, 2009).

BARRERA DE TRANSMISIÓN

Los agentes priónicos pueden transmitirse dentro de las especies de mamíferos a la que está adaptado, pero también entre ellas. Lo normal es una transmisión intra-especie, manteniendo las características de la enfermedad, mientras que la transmisión inter-especie es impredecible ya que, en algunos casos, no se desarrolla ninguna EET, y en otros se desarrolla de forma subclínica. En el caso de que se produzca la transmisión a la nueva especie, la EET puede permanecer con características idénticas a la original o mostrar unas características completamente diferentes debido a la adaptación a su nuevo huésped (Bruce & Dickinson, 1987; Kimberlin et al., 1987; Kimberlin et al., 1989; Peretz et al., 2002).

Anteriormente este concepto fue descrito como “barrera de especies” (Pattison, 1965) y se define como la resistencia que un individuo presenta a infectarse con una EET proveniente de otra especie. En la primera exposición, supone periodos de incubación incluso superiores a la vida del individuo. Sin embargo, cuando se producen varios pases en la nueva especie, sufre una adaptación, por lo que su transmisión se hace más eficiente y con ello se reducen los periodos de incubación que se observaron en la primera transmisión (Priola, 1999).

Los primeros estudios atribuyeron esta barrera de especie a las diferencias entre las secuencias de PrP^C de la especie donante y la receptora (Bartz et al., 1994; Scott et al., 1989). Se observó que cambios mínimos en la secuencia de la PrP^C suponen un gran impacto en la susceptibilidad de la especie frente a la infección con una cepa priónica específica. Sin embargo, otro factor que también es muy importante es la cepa priónica, la cual se define como priones con diferencias en su estructura terciaria y cuaternaria,

que dan lugar a distintas conformaciones estables que se propagan eficientemente provocando distintos fenotipos clínico-patológicos en un mismo hospedador (Bartz et al., 2000; Peretz et al., 2001). La transmisión de priones clásicos de ECJ a ratones convencionales es difícil o falla, mientras que los ratones transgénicos que expresan PrP humana (y no de ratón) carecen por completo de una barrera de especies (Collinge et al., 1995; Hill et al., 1997). Sin embargo, los priones de vECJ, a pesar de tener una estructura primaria de PrP idéntica a la de los priones de ECJ clásicos, se transmiten mucho más fácilmente a los ratones de tipo salvaje, mientras que la transmisión a los ratones humanizados es ineficaz (Hill et al., 1997). Por lo tanto, dos cepas propagadas en el mismo hospedador pueden tener barreras completamente diferentes con respecto a otra especie. A partir de este momento se englobaron los términos de “barrera genotípica” y “barrera de cepa” en un concepto único denominado barrera de transmisión. (Hill et al., 2000; Supattapone et al., 1999).

Factores que determinan la barrera de transmisión

1. Genotipo

Se han descrito numerosos polimorfismos del gen *PRNP* responsables de algún elemento de susceptibilidad o resistencia a las enfermedades priónicas (Bossers et al., 1997). En las ovejas, se ha estudiado ampliamente la influencia del gen *PRNP* en la susceptibilidad o resistencia al scrapie. Los genotipos VRQ/VRQ, VRQ/ARQ y ARQ/ARQ se han asociado a la susceptibilidad al scrapie, y por otro lado, el genotipo ARR/ARR se ha asociado a un mayor nivel de resistencia (Bossers et al., 1996; Hunter, 1997; Hunter et al., 1996). En el caso de las cabras, diversos estudios del gen *PRNP* caprino han mostrado 17 mutaciones silenciosas y más de 40 sustituciones de aminoácidos, de las cuales al menos ocho parecen estar asociadas

a la resistencia al scrapie: G127S, I142M, H143R, S146N, S146D, R154H, R211Q y Q222K (Bouzas et al., 2010; Goldmann et al., 2011; Serrano et al., 2009; Vaccari et al., 2009). Varios estudios en ciervos han mostrado una asociación entre los polimorfismos del gen *PRNP* y la modulación de la ECC (Green et al., 2008; Johnson et al., 2003; O'Rourke et al., 1999). También en los humanos, los codones 129 y 219 son muy importantes en términos de susceptibilidad a las enfermedades priónicas (Collinge et al., 1991; Jeong et al., 2005; Kovacs et al., 2000).

2. Cepa priónica

La cepa priónica es un elemento de gran importancia para entender el concepto de barrera de transmisión, ya que no solo la secuencia de la PrP^C influye en la transmisión inter-específica, sino que, además, la cepa priónica tiene un papel principal, por lo que este hecho se catalogó como “barrera de cepa” (Scott et al., 2005). Esta barrera de cepa ha sido observada y demostrada en numerosos trabajos. En 1999, Scott demostró que ratones que expresaban la PrP^C bovina eran capaces de infectarse con aislados de scrapie ovino (Scott et al., 1999) y eran resistentes frente a otros aislados. También se observó que ratones transgénicos que expresaban la PrP^C bovina podían infectarse con la vECJ a los ~270 días, pero necesitaban más de 500 días para sucumbir a la sECJ subtipo MM1 (Giles et al., 2010; Scott et al., 2005). También se observó la capacidad que tenía la EEB para transmitirse con facilidad a un gran número de especies sin apenas alterar sus propiedades bioquímicas o neuropatológicas (Collinge et al., 1996; Torres et al., 2014). Por tanto, está demostrado que las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de la PrP^{Sc} del inóculo y la PrP^C del huésped son insuficientes para explicar el fenómeno de la barrera de transmisión. Y por ello se comenzó a hablar de

“barrera de transmisión” para referirse de forma conjunta a estos dos fenómenos (barrera de especie y barrera de cepa) (Collinge, 1999; Supattapone et al., 1999).

La evolución de las cepas priónicas se puede explicar mediante el modelo de selección conformacional (Collinge & Clarke, 2007) el cual, define a las cepas como mezclas o “nubes” de conformaciones de PrP^{Sc} diferentes, entre las cuales existe una predominante que determina las características fenotípicas de la enfermedad. A pesar de ello, existen presentes isoformas de PrP^{Sc} minoritarias, en ocasiones llamadas “subcepas” o “cuasi-especies”. La hipótesis asume que la proteína prion celular del nuevo huésped seleccionaría (y amplificaría) de entre el prion infeccioso la conformación que más se adaptara a ella. Por otro lado, la hipótesis del “modelado deformado” (Makarava & Baskakov, 2013) sugiere que las diferentes conformaciones se forman de manera espontánea y si una conformación no es capaz de propagarse en el nuevo huésped, se puede producir una distorsión de la fibra amiloide generando una nueva cepa. Ambas hipótesis permiten explicar los diferentes fenómenos observados de divergencia de cepas en las enfermedades priónicas, por lo que se asume que estas dos hipótesis no son excluyentes (Baskakov, 2014).

Caracterización de cepas priónicas

Fue en los años 60 cuando se detectaron las primeras evidencias de la existencia de diferentes cepas priónicas, ya que se observó que cabras inoculadas experimentalmente con scrapie ovino desarrollaban signos clínicos distintos y bien diferenciados. Por un lado, animales con una hiperexcitación “scratching” y por otro, animales con somnolencia “drowsy”(Pattison et al., 1959; Pattison & Millson, 1961). Estas diferencias se mantuvieron en pases seriados en el mismo hospedador y con todo

ello demostraron e introdujeron el concepto de “cepa”, definido como las diferentes patologías que podían desarrollar los individuos afectados por enfermedades priónicas desde el punto de vista clínico y bioquímico. A estos experimentos, poco tiempo después les siguieron estudios sobre la transmisión experimental de material infeccioso en ratones, que desarrollaban los mismos síntomas y lesiones histopatológicas detectados en las ovejas y cabras con scrapie (Chandler, 1961).

La identificación de cepas priónicas se fundamenta en un conjunto de características biológicas y fisicoquímicas. Inicialmente, la caracterización de cepas se basó en el fenotipo de la enfermedad (Fraser & Dickinson, 1968). Otro de los parámetros más utilizados tradicionalmente para distinguir cepas ha sido el periodo de incubación, ya que observaron que diferentes cepas priónicas inoculadas en un mismo modelo daba lugar a diferentes periodos de incubación (Bruce, 1993; Westaway et al., 1987). Sin embargo, hay que tener en cuenta que algunas características de las cepas pueden variar según la línea de ratón con la que se trabaje y la vía de inoculación. En 1968, Fraser y Dickinson introdujeron el concepto de “perfil lesional” como un parámetro importante para la caracterización y tipificación de cepas priónicas (Fraser & Dickinson, 1968). Además, en 1973, observaron que el perfil lesional se mantenía constante en las diferentes cepas (Fraser & Dickinson, 1973). La lesión histopatológica más característica de las EET es la degeneración vacuolar de la sustancia gris (Bruce & Fraser, 1991). Para realizar el perfil lesional se valora la vacuolización de diferentes áreas cerebrales como son: núcleos dorsales de la médula oblongada, corteza del cerebelo, puente, hipotálamo, tálamo, corteza cerebral a nivel de tálamo, hipocampo, área septal, mesencéfalo, diencefalo, ganglios basales y corteza frontal del cerebro.

Con el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas, el uso de la técnica de inmunohistoquímica supuso un gran avance para la caracterización y diferenciación de cepas. De hecho, los perfiles inmunohistoquímicos se realizan analizando los depósitos de PrP^{Sc} en las diferentes áreas cerebrales anteriormente citadas y además se valora la magnitud de cada uno de los patrones de depósito de la proteína prion, clasificados en función de su morfología y localización (Gonzalez et al., 2012; Gonzalez, Siso, et al., 2010; Jeffrey et al., 2003). Esto tuvo una gran importancia ya que permitió relacionar directamente la vECJ con la EEB, ya que presentaban las mismas características neuropatológicas (Bruce et al., 1997; Scott et al., 1999). Se han descrito 14 tipos diferentes de depósito de PrP^{Sc}, clasificados de manera subjetiva de 0 (ausente) a 3 (severo) (Gonzalez et al., 2014):

1. Intra-neuronal: Depósitos múltiples de PrP^{Sc} en el pericarion neuronal, alrededor del núcleo o debajo de la membrana plasmática. Se encuentra en la mayoría de las regiones cerebrales, aunque es menos común en las células de Purkinje.
2. Intra-astrocítico: Depósitos granulares de PrP^{Sc} alrededor del núcleo de los astrocitos, que pueden estar extendidos por todo el cerebro, pero son particularmente notables en la sustancia blanca cerebelosa y en los tractos espinocerebelosos.
3. Intramicroglial: Presencia de grandes gránulos alrededor de los núcleos de las células de la microglía.
4. Particulado fino: Presencia de un punteado fino en el neuropilo. Generalmente son más visibles en el tálamo, el hipotálamo y el tronco cerebral.
5. Presencia de depósitos amorfos asociado a la glía.
6. Perineuronal: Depósito de PrP^{Sc} alrededor de las neuronas.

7. Lineal: Depósitos de PrP^{Sc} en forma de hilo, más o menos continuos que parecen asociarse a axones neuronales.
8. Estrellado: Depósitos de PrP^{Sc} ramificados en forma estrellada a menudo localizados alrededor de las células de la glía.
9. Subpial: Depósitos de PrP^{Sc} en forma de agregados amorfos de grosor variable, continuos o multifocales, localizados debajo de la piamadre.
10. Subependimal: Depósitos de PrP^{Sc} en forma de agregados amorfos de grosor variable, continuos o multifocales, localizados debajo de la capa de células ependimales.
11. Perivascular: Depósitos de PrP^{Sc} en forma de agregados amorfos de grosor variable, continuos o multifocales, localizados alrededor de los vasos sanguíneos.
12. Perivacuolar: Acumulación de PrP^{Sc} alrededor de vacuolas presentes en la sustancia gris o de espacios en la sustancia blanca. Son más prominentes en la materia blanca cerebral y cerebelosa.
13. Placas vasculares: Depósitos coalescentes de PrP^{Sc} irregularmente redondos o ligeramente ramificados que se acumulan alrededor de un núcleo intensamente teñido que se encuentran asociados a un vaso sanguíneo.
14. Placas no vasculares: Depósitos coalescentes de PrP^{Sc} irregularmente redondos o ligeramente ramificados que se acumulan alrededor de un núcleo intensamente teñido.

Los signos clínicos, el periodo de incubación, las lesiones histopatológicas y el patrón inmunohistoquímico de la PrP^{Sc} constituyen las principales propiedades biológicas que permiten diferenciar a unas cepas de otras. Además, cada cepa priónica se asocia a unas características bioquímicas concretas, siendo de especial importancia para la

diferenciación de las mismas. Entre ellas destacan el patrón de glicosilación de la PrP^{Sc} y su movilidad electroforética tras la digestión con Proteinasa K (PK) (Bessen & Marsh, 1992; Collinge et al., 1996; Khalili-Shirazi et al., 2005; Parchi et al., 1996). La técnica de Western Blot permite determinar el patrón de glicosilación de tres bandas que depende de las proporciones relativas que presenta de las formas diglicosilada, monoglicosilada y no glicosilada y del sitio de corte de la PK (Parchi et al., 1996). En el scrapie ovino se han conseguido identificar de forma natural 3 cepas diferentes de las 20 que existen: SSBP/1 (Dickinson et al., 1968), CH1641 (Foster & Dickinson, 1988) que tiene un perfil molecular similar a la EEB, y por último en 1998 se descubrió una nueva cepa de scrapie que presentaba una banda marcada en 12kDa y fue denominada como Nor98 (Benestad et al., 2003) responsable del scrapie atípico. En la EEB se ha conseguido identificar dos cepas atípicas bien diferenciadas a la ya conocida forma clásica (también denominada como EEB-C), que se conocen como EEB-L y EEB-H. La EEB tipo L destaca por una banda no-glicosilada con un menor peso molecular y unas proporciones de las tres glicofomas distintas de la EEB clásica (Casalone et al., 2004), en contraposición, la EEB tipo H destaca por una banda no glicosilada con un mayor peso molecular, pero con unas proporciones de las tres glicofomas similares a la EEB clásica (Biacabe et al., 2004) (Figura 4).

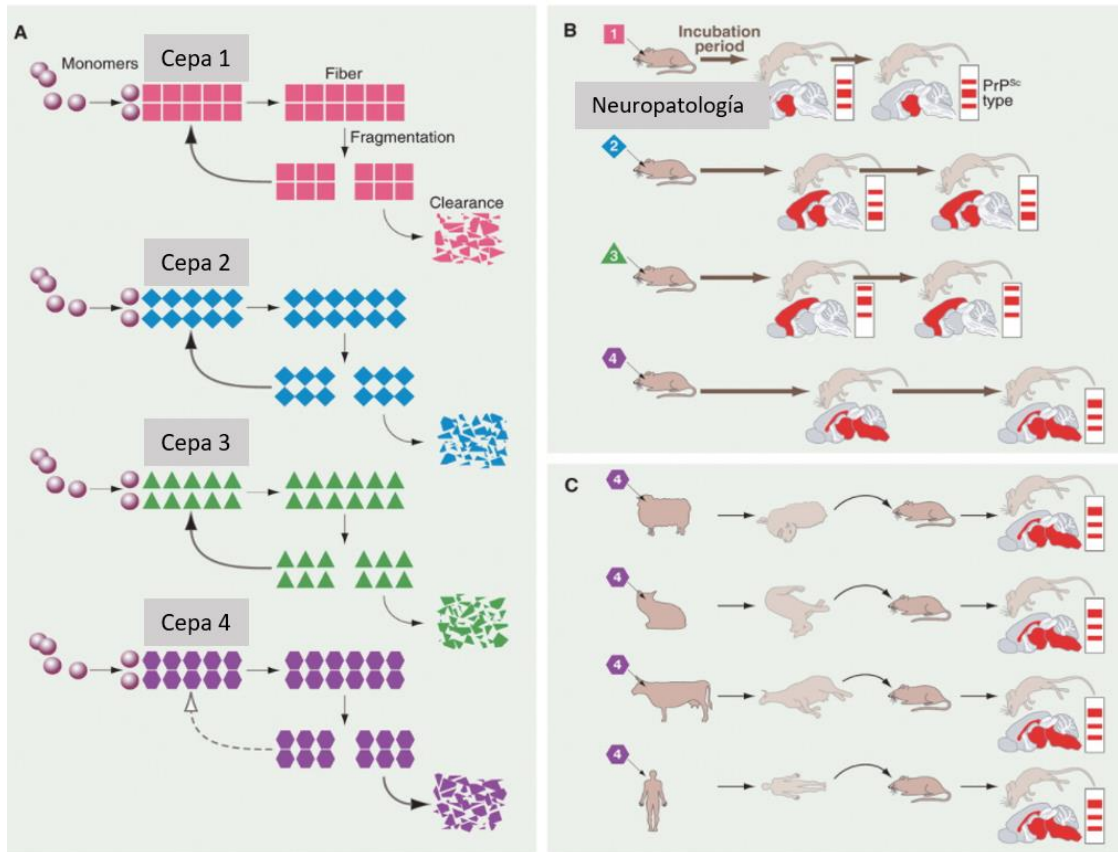


Figura 4. Esquema de diferenciación de cepas. **A)** Pueden propagarse distintos tipos de polímeros de PrP, lo que da lugar a diferentes cepas. **B)** Las cepas pueden diferenciarse por los períodos de incubación (longitud de la flecha) y la neuropatología (área cerebral sombreada), los patrones de glicosilación se observan a cada lado de ellas y se mantienen en pases seriados. **C)** las propiedades de una cepa pueden conservarse tras su paso intermedio por una especie diferente con una PrP^C distinta, y su posterior aislamiento en el huésped original. (Collinge & Clarke, 2007).

PATOGENIA

De forma natural, la puerta de entrada principal del prion es la vía oral, mediante la ingestión de material contaminado. En el caso del scrapie natural penetra en el organismo principalmente por las placas de Peyer del íleon distal y del yeyuno y lo hacen a través del tejido linfoide primario asociado al tracto gastrointestinal (GALT: *Gut-Associated Lymphoid Tissue*). Por ello, la susceptibilidad a la enfermedad es mayor a edades tempranas (St Rose et al., 2006). En este proceso, desempeñan un papel importante los enterocitos modificados denominados células M, que son capaces de captar proteínas como la PrP^{Sc} e incorporarlas al tejido linfoide subepitelial (Mabbott & Bruce, 2001) en el cual estas proteínas se acumulan y replican tanto en los macrófagos de cuerpo tingible como en las células dendríticas foliculares, las cuales son las principales responsables del desarrollo inicial de la enfermedad (Heggebo et al., 2002; Jeffrey et al., 2001; Lezmi et al., 2001; van Keulen et al., 1996). A esta etapa, en la que la PrP^{Sc} ya se encuentra en el tejido linfoide pero todavía no existen signos clínicos, se le conoce como fase preclínica de la enfermedad y por ello en el caso del scrapie puede realizarse un diagnóstico temprano mediante la obtención de biopsias, de la tonsila palatina, del tercer párpado y del tejido linfoide de la mucosa rectal (Gonzalez et al., 2008; Langeveld et al., 2006; Monleon et al., 2005; Vargas et al., 2006).

Se considera que la puerta de entrada del agente al sistema nervioso es el sistema nervioso entérico (SNE) lo que se demuestra por la observación de acúmulos de PrP^{Sc} en los ganglios y plexos mientérico y submucoso del SNE, que se distribuyen paralelamente al sistema linforreticular intestinal (Beekes & McBride, 2000; Beekes et al., 1998). En cuanto a cómo el prion es capaz de pasar del SLR al SNE, hay estudios que

sugieren que se debe a fibras nerviosas que inervan los folículos linfoides (Bencsik, Lezmi, & Baron, 2001; Bencsik, Lezmi, Hunsmann, et al., 2001; Heggebo et al., 2003). Posteriormente se produce la neuroinvasión, en la que la PrP^{Sc} pasa del SNE al SNC a través de dos vías (Figura 5) (Beekes et al., 1998; Race et al., 2000; van Keulen et al., 2002):

- Vía directa: asciende a través de las fibras nerviosas parasimpáticas eferentes desde el SNE hasta el núcleo motor dorsal del nervio vago en la médula oblongada. No hay multiplicación explícita en el sistema linforreticular.
- Vía indirecta: se produce a través de los nervios esplácnicos, alcanzando la columna intermedia lateral de la médula espinal torácica. Esta vía implica indirectamente a los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y el sistema nervioso periférico.

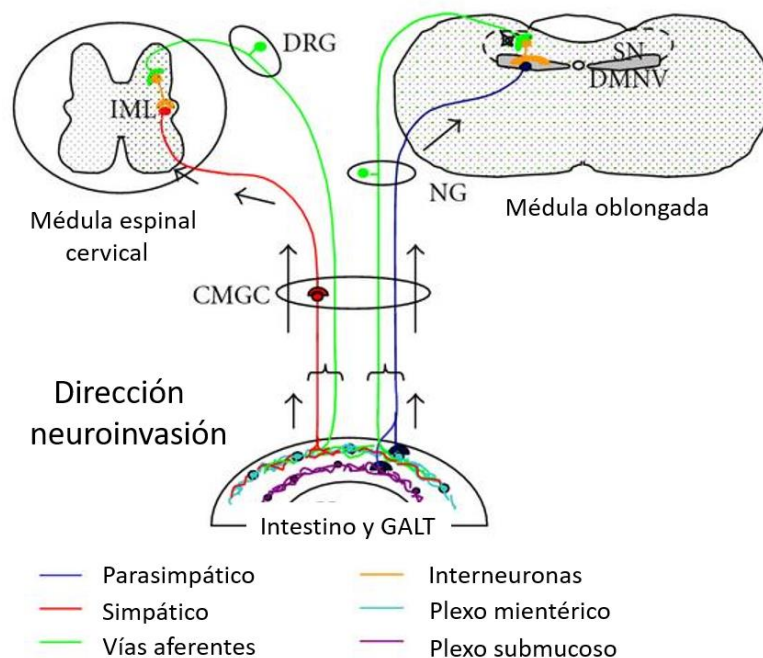


Figura 5. Representación esquemática de las rutas de neuroinvasión en las EET. (Sisó et al., 2010). DRG: Ganglio de la raíz dorsal; NG: Ganglio nodoso; CMGC: Complejo de ganglio celiaco y mesentérico; IML: Columna intermedia lateral; DMNV: Núcleo motor dorsal del nervio vago

En la mayor parte de las EET, el prion se acumula y se replica en los órganos linfoides secundarios antes de que ocurra la neuroinvasión, por lo que estas enfermedades son consideradas linfotrópicas. No obstante, en algunos casos la invasión ocurre directamente al SNC sin requerir una fase de replicación periférica, considerándose en este caso de carácter neurotrópico (Beringue et al., 2012). Éste es el caso de la EEB, en la que la implicación del SLR es mínima (Buschmann & Groschup, 2005), y se sigue una ruta de neuroinvasión directa, a través del SNP, desde el intestino hasta el SNC sin la participación del SLR (Hoffmann et al., 2007). En el caso de la EEB en pequeños rumiantes se observa la acumulación de la PrP^{Sc} en el SLR (Foster et al., 1993), resultados que hacen sospechar que el agente de la EEB se comporta de la misma manera que el agente del scrapie en estas especies.

Varios estudios parecen indicar que la sangre puede tener un papel importante en la distribución de la PrP^{Sc}, al detectarse en ella y en los órganos circunventriculares de ovinos infectados con scrapie y con EEB (Terry et al., 2009; Thorne & Terry, 2008) y también en pacientes humanos con vECJ (Llewelyn et al., 2004; Peden et al., 2004; Wroe et al., 2006). Experimentos realizados en 2008 respaldan estos resultados, ya que en ellos se observó la infección de animales sanos mediante transfusiones sanguíneas de animales en fase clínica y preclínica de la enfermedad (Houston et al., 2008; Hunter et al., 2002). En cuanto a la EEB, no se detectó la presencia de PrP^{Sc} en órganos circunventriculares ni en tejidos periféricos, lo que no respalda la participación de la vía hematogena (Siso et al., 2012).

Cuando el prion alcanza el SNC, se disemina por el mismo, en mayor o menor medida, por las diferentes áreas cerebrales (Kimberlin & Walker, 1980) dependiendo de

la especie animal, el periodo de incubación, la vía de inoculación, la susceptibilidad genética del individuo y principalmente en función de la cepa priónica (Fraser & Dickinson, 1968). A medida que el prion se ha diseminado por el SNC va apareciendo neurodegeneración, vacuolización y gliosis en el tejido cerebral. Por otro lado, se ha demostrado que los priones también pueden llevar a cabo una diseminación centrífuga, es decir desde el SNC hasta los diferentes órganos y tejidos. En el caso del scrapie se ha descrito la presencia de PrP^{Sc} en diversas localizaciones como:

- Nervios periféricos: Con los que llega a los diferentes órganos y tejidos. Estos son los nervios isquiático, mediano, tibial, fibular, axilar y ulnar en el caso de la oveja (Groschup et al., 1996), y los nervios ciático y braquial en cabras (C. Lacroux et al., 2014).
- Glándulas adrenales: Se detecta tanto en ovinos (Garza et al., 2014), como en caprinos tanto en la medular como en la región fascicular del córtex (Acin et al., 2013).
- Glándula mamaria: La presencia de PrP^{Sc} suele estar relacionada con inflamaciones crónicas producidas por Lentivirus como el Maedi-Visna en ovejas (Lacroux et al., 2008) y el virus de la artritis encefalitis caprina en cabras (Gonzalez, Martin, et al., 2010).
- Glándula salivar: En ovejas sí se ha detectado la presencia de PrP^{Sc} en las diferentes células de las glándulas (Vascellari et al., 2007). En cabras solo se ha detectado tras inoculación intracraneal (Acutis et al., 2012).
- Riñón: Se detectó PrP^{Sc} en la papila renal, posiblemente distribuida por vía hematogena (Garza et al., 2014; Siso et al., 2008). En cabras solo se ha detectado tras inoculación intracraneal (Acutis et al., 2012).

- Vejiga: Se observó la presencia de PrP^{Sc} en el músculo liso de la pared vesical (Garza et al., 2014). En cabras solo se ha detectado tras inoculación intracraneal (Acutis et al., 2012).
- Piel: La proteína fue detectada en el estrato basal de la epidermis de una oveja (Garza et al., 2014). En cambio, en cabras ha sido imposible encontrarla hasta el momento.
- Pulmón: Se demostró la presencia de PrP^{Sc} en pulmón asociada a tejido linfoide (Garza et al., 2014; Jeffrey & Gonzalez, 2007; Ryder et al., 2009; Salazar et al., 2010). En el caso del ganado caprino, no ha sido detectada.
- Hígado: En ovino se ha detectado en las células de Kupffer (Everest et al., 2011), sin embargo, en cabras no se ha detectado acumulo de PrP^{Sc}.
- Páncreas: Solo se ha demostrado la presencia de PrP^{Sc} en neuronas parasimpáticas postganglionares en ovejas (Garza et al., 2014).
- Músculo esquelético: Se detectó acumulación de PrP^{Sc} en los músculos psoas mayor, supraespinal, semimembranoso y lengua (Andreoletti et al., 2004; Casalone et al., 2005; Garza et al., 2014), además de en las fibras nerviosas que acompañan a estos músculos (Garza et al., 2014). En el caso de las cabras, se ha descrito en la lengua (Acin et al., 2013) y se ha encontrado infectividad en el músculo psoas mayor mediante bioensayo en ratones (Aguilar-Calvo et al., 2015). Mediante la técnica de Western Blot también se detectó PrP^{Sc} en los músculos tríceps braquial y bíceps femoral tras inoculación intracerebral (Acutis et al., 2012).

En el caso de la EEB se ha demostrado la presencia de PrP^{Sc} mediante técnicas convencionales en el nervio vago, ganglio nervioso celiaco y en el hígado (Everest et al., 2011; Foster et al., 2001).

Varios estudios epidemiológicos indican que la transmisión natural del scrapie clásico se produce principalmente de forma horizontal, ya sea por contacto directo entre animales (Hoinville, 1996) o indirectamente a través de la contaminación del medio ambiente. La principal causa de contaminación ambiental son las placentas, las heces (Safar et al., 2008; Terry et al., 2011) y los cadáveres de animales muertos en la explotación. Además de ellas, también favorece indirectamente a la contaminación ambiental la excreción de orina (Rubenstein et al., 2011) y la secreción de leche y saliva (Gough et al., 2012; Maddison et al., 2010). En el caso de la ECC también se ha demostrado que los priones son expulsados al medio a través de secreciones y excreciones, como las heces, orina y saliva (Haley et al., 2009; Mathiason et al., 2006; Tamguney et al., 2009). En la EEB no hay evidencias de que exista propagación horizontal o transmisión vertical en condiciones naturales (Curnow & Hau, 1996; Wrathall et al., 2002) por lo que se acepta que el ganado bovino infectado fue alimentado con harinas de carnes y hueso obtenidas de rumiantes infectados por EET. Tras la retirada de las mismas, la incidencia de la EEB se redujo drásticamente. Además, de forma experimental, se observó en ovejas inoculadas con EEB, que el agente infeccioso pasó a los corderos, aunque todavía no se conoce si fue transmisión perinatal o in útero (Bellworthy et al., 2005).

FACTORES GENÉTICOS

A día de hoy, se conocen tres genes que codifican las enfermedades priónicas: *PRNP* (codifica la proteína prion, PRP), *SPRN* (codifica la proteína Shadoo, Sho) y *PRND* (codifica la proteína doppel, Dpl) (K. Basler et al., 1986; Premzl et al., 2003; Watts & Westaway, 2007). La mayoría de las enfermedades priónicas y por ello tanto su susceptibilidad como su patogénesis están moduladas principalmente por el gen *PRNP*.

Gen *PRNP*:

El gen *PRNP* se encuentra localizado en el cromosoma 20 en el ser humano, 2 en el ratón, 22 en el caballo y en el cromosoma 13 en los rumiantes (Sparkes et al., 1986). Tiene una longitud variable, dependiendo de la especie: 20.578 pares de bases (pb) en la oveja (*Ovis aries*) (U67922), 20.689 pb en la cabra (*Capra hircus*) (EU870890), 78.056 pb en la vaca (*Bos taurus*) (AJ298878), 65.476 pb en el ciervo mula (*Odocoileus hemionus*) (AY330343) y 15.308 pb en el caso del caballo (NC_009165). En la mayoría de las especies el gen *PRNP* está compuesto por dos exones, a excepción de las ovejas, ratas y ratón que poseen tres.

La proteína PrP^C esta codificada por el exón terminal en el cual se encuentra un marco de lectura abierto (ORF, del inglés: *Open Reading Frame*). Esta proteína (PrP^C) está formada por entre 230 y 256 aminoácidos, presentando en muchos casos una homología nucleotídica muy elevada entre diferentes especies, como es el caso de la oveja y la vaca, las cuales coinciden en un 94%. En el caso del gen *PRNP* humano, presenta una homología del 65,4% con el ovino y del 66,7% con el bovino.

Las mutaciones del gen *PRNP* pueden reflejarse en diferentes partes de la secuencia de PrP^C, lo que supone un cambio de eficiencia de transmisión dependiendo de la zona en la que se produzca. Hay una región que se considera crítica en la estructura de la PrP^C, se trata del bucle $\beta 2\text{-}\alpha 2$ de la proteína priónica (residuos 165-175 en la proteína priónica del ratón), ya que un mínimo cambio en su secuencia de aminoácidos influye seriamente en la susceptibilidad de los ratones al scrapie, la EEB, el scrapie adaptado a ratón, la ECC y el scrapie adaptado al hámster (Bett et al., 2012). También tiene mucha importancia en caballos ya que se consideran animales altamente resistentes a la infección con priones y se ha demostrado por numerosos estudios que la estructura de la PrP^C de caballo contiene una mayor definición estructural del bucle $\beta 2\text{-}\alpha 2$ en comparación con la PrP^C de ratón (Perez et al., 2010). También se ha demostrado que la PrP^C canina muestra una gran resistencia al malplegamiento (Bian et al., 2017; Khan et al., 2010; Polymenidou et al., 2008; Vidal et al., 2013).

Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie ovina:

Las primeras investigaciones destinadas a la identificación de una base genética que pudiera explicar la diferencia en cuanto a la susceptibilidad y al desarrollo de las EET se llevaron a cabo en la especie ovina. De hecho, la influencia de la genética del hospedador en esta especie es una de las más conocidas y que distintos polimorfismos del gen *PRNP* se relacionan con la susceptibilidad al scrapie en ovinos. Los polimorfismos más importantes están asociados a los codones 136, 154 y 171, cuya combinación de polimorfismos da lugar a cinco haplotipos: ARQ, ARR, VRQ, AHQ, ARH, de los cuales, los genotipos VRQ/VRQ, VRQ/ARQ y ARQ/ARQ están asociados con la susceptibilidad al scrapie y el genotipo ARR/ARR se ha relacionado con el nivel más alto de resistencia

frente a la misma (Belt et al., 1995; Bossers et al., 1996; Hunter, 1997; Hunter et al., 1996). Esta combinación de haplotipos dio lugar a una agrupación por parte de Comisión Europea para establecer diferentes niveles de riesgo (Tabla 2):

- R1: Ovinos con genotipo más resistente; ARR/ARR. Indica un riesgo muy bajo de desarrollar la enfermedad en un individuo y su progenie.
- R2: Ovinos con genotipos con una resistencia alta; ARR/ARQ, ARR/ARH/, ARR/ARQ. Indica un riesgo bajo para un individuo y su progenie.
- R3: Ovinos con genotipos de escasa resistencia genética; ARQ/ARH, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH, ARQ/ARQ. Indica un riesgo individual bajo, pero el de la progenie puede aumentar en función del genotipo del otro progenitor.
- R4: Ovinos con genotipo susceptible; ARR/VRQ. Indica que la enfermedad puede encontrarse ocasionalmente y que la progenie tiene un riesgo mayor.
- R5: Ovinos con alta susceptibilidad genética: ARQ/VRQ, ARH/VRQ, AHQ/VRQ Y VRQ/VRQ. Indica que tienen un riesgo muy alto de desarrollar scrapie.

Tabla 2: Diferentes genotipos de la combinación de los 5 haplotipos ovinos.

Genotipo	Estatus de Scrapie	Tipo
ARR / ARR	Ovinos más resistentes	R1
ARR / AHQ ARR / ARH ARR / ARQ	Ovinos resistentes pero con un manejo cuidadoso en programas de mejora genética	R2
ARQ / ARH ARQ / AHQ AHQ / AHQ ARH / ARH AHQ / ARH ARQ / ARQ	Ovinos con escasa resistencia genética	R3
ARR / VRQ	Ovinos genéticamente susceptibles y que no deben de usarse para la reproducción salvo excepciones controladas	R4
AHQ / VRQ ARH / VRQ ARQ / VRQ VRQ / VRQ	Ovinos con elevada susceptibilidad genética y que no deben de usarse para la reproducción	R5

Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie caprina:

En el caso del ganado caprino, la asociación de los genotipos y su variabilidad genética parece ser más compleja, probablemente debido a la incidencia más baja del scrapie en esta especie. La primera referencia que aparece en la literatura sobre la susceptibilidad o resistencia a la enfermedad de scrapie en cabras modulada por un control genético fue en el año 1961 (Pattison & Millson, 1961), al observar que existían diferencias en el periodo de incubación cuando se inculaba experimentalmente el scrapie en cabras. Estas diferencias indicaban variaciones en la susceptibilidad de los animales inoculados. Estudios realizados en scrapie natural y experimental muestran cómo variaciones alélicas del gen *PRNP* pueden modular la susceptibilidad y resistencia a la enfermedad (Goldmann et al., 1996). No obstante, distintos estudios describen más de 40 mutaciones con cambio aminoacídico y 17 mutaciones silentes en el gen *PRNP*. Algunas variaciones alélicas en el gen *PRNP* podrían proteger a las especies contra la

enfermedad, o al menos ampliar el período de incubación. Los polimorfismos descritos que actúan de esa manera son: S/G127, I/M142, G/D145, H/R143, N/S146, N/D146, R/H154, R/Q211 y Q/K222 (Acutis et al., 2012; Agrimi et al., 2003; Billinis et al., 2002; Goldmann et al., 1996; Papasavva-Stylianou et al., 2007; Serrano et al., 2009; Wopfner et al., 1999; Zhang et al., 2004).

En el año 2011 se demostró la asociación del polimorfismo I/M142 con un incremento de la resistencia al scrapie, al igual que una reducción en la probabilidad de desarrollar síntomas clínicos en animales que codifican serina para el codón 127 (Goldmann et al., 2011).

En cuanto a la resistencia frente a la EEB en cabras, se han realizado pocos estudios. El polimorfismo I/M142 está asociado a un ligero aumento de los periodos de incubación después de las inoculaciones experimentales de EEB (Goldmann et al., 1996). Se han llevado a cabo estudios experimentales valorando la transmisión oral de EEB caprina en cabras portadoras de las mutaciones R/Q211 y Q/K222; demostrándose que, mientras el polimorfismo R/Q211 extiende el periodo de incubación, solo el alelo K222 parece tener un efecto protector después de la infección oral (Aguilar-Calvo et al., 2015). Esto sugirió que el polimorfismo Q /K222 es un buen candidato para establecer un programa de mejora genética para erradicar la EEB en cabras.

El proyecto GOAT-TSE-FREE de EMIDA ERA-NET ha proporcionado resultados complementarios del polimorfismo Q/K222. De hecho, se buscaron más datos sobre el efecto del alelo K222 en la resistencia al scrapie y a la EEB, tanto en cabras como en roedores transgénicos. Esos estudios demostraron que este polimorfismo es el más protector en los estudios realizados con hospedadores naturales, ya que determinó una

prolongación del período de incubación frente a scrapie y la EEB bovina, pero no tuvo un gran efecto contra la EEB caprina tras la exposición intracerebral (ni en heterocigosis, ni en homocigosis). Esto reafirma los resultados obtenidos por Aguilar-Calvo en 2015 en ratones transgénicos, y sugiere que un programa para mejorar la resistencia contra las EET basado en la selección de portadores del alelo K222 podría prevenir eficazmente la infección frente a scrapie e incluso la EEB, pero no así frente a la EEB caprina (Aguilar-Calvo et al., 2015).

Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie bovina:

Los polimorfismos del gen *PRNP* descritos en la especie bovina (W/R84, G/S100, K/R113, V/M115, H/R143, S/N146 y N/S177) tienen poca repercusión sobre la susceptibilidad o resistencia a la EEB. Sí se ha observado en diversos estudios que la inserción o delección de 12 y 23 pares de bases en la región promotora del gen *PRNP* puede influir en la susceptibilidad y la resistencia frente a la EEB (Haase et al., 2007; Juling et al., 2006). Estudios recientes en bóvidos, demostraron que todos los animales afectados por la EEB atípica eran homocigotos para una delección de 23 pb en el sitio de unión del factor de transcripción de *PRNP*, y mostraron una mayor prevalencia de un alelo de delección de 12 pb (Gurgul et al., 2012).

También se ha identificado un caso de EEB atípica con una mutación E/K211 que es homóloga a la mutación E/K200 humana, que está relacionada con la FECJ (Nicholson et al., 2008).

Polimorfismos del gen *PRNP* en cérvidos:

Numerosos polimorfismos en ciervos han sido relacionados con la resistencia o susceptibilidad frente a la ECC. Un cambio de metionina a leucina en el codón 132 del gen *PRNP* fue descrito en 1999 como un polimorfismo con carácter protector frente a la ECC en el alce de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*) (O'Rourke et al., 1999). En estudios posteriores también se observó el efecto protector de este polimorfismo en esta misma especie en animales infectados por vía oral (Hamir et al., 2006) . Sin embargo en estudios posteriores realizados en animales de vida libre no se observó ninguna asociación con la susceptibilidad (Perucchini et al., 2008).

También se ha observado que los ciervos mula (*Odocoileus hemionus*) homocigotos para serina en el codón 225 mostraron mayor susceptibilidad a la enfermedad (Jewell et al., 2005).

En el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) son varios los polimorfismos descritos hasta el momento (G/E65, Q/H95, G/S96 y A/G116). Destaca la presencia de serina en el codón 96 y de histidina en el codón 95 ya que proporcionan una menor susceptibilidad a la ECC respecto a la que muestran animales sin estos polimorfismos (Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2006; O'Rourke et al., 2004).

Además, en China y Corea, se observaron polimorfismos en los codones S/G100 y E/Q226 en ciervos sika (*Cervus nippon*) (Jeong et al., 2007; Meng et al., 2005).

En 2009 se describieron en Europa las primeras mutaciones detectadas en el ciervo rojo europeo. Fue en Italia (*Cervus elaphus elaphus*) con la detección de los polimorfismos G/S59, T/A98 y Q/E226, y en Escocia (*Cervus elaphus scoticus*) con la

detección de T/A98, P/S168 y Q/E226 (Peletto et al., 2009). En las poblaciones afectadas por la ECC, los polimorfismos Q226 y E226 están constantemente sobrerrepresentados entre los casos afectados por la enfermedad (Guere et al., 2020; Haley et al., 2019; Jewell et al., 2005), lo que sugiere que aumentan la susceptibilidad a la ECC. También recientemente, se ha observado que las sustituciones M/L132 en alces (Moore et al., 2018; White et al., 2010) y G/S96 en el ciervo de cola blanca (Haley et al., 2019) se asocian con un menor riesgo y una progresión más lenta de la caquexia crónica.

Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie equina:

Dado que nunca se han detectado casos de infección por priones en caballos, se han llevado a cabo diversos estudios para identificar los factores que contribuyen a la resistencia de la enfermedad priónica. Uno de los aspectos principales estudiados son los polimorfismos del gen *PRNP*. Los primeros datos acerca de polimorfismos en caballos fueron publicados en el año 2018, en el que detectaron el polimorfismo N/K175, muy común en toda la población analizada. Mediante el uso de programas informáticos como PolyPhen-2, PROVEAN y PANTHER se determinó el impacto de este polimorfismo en la proteína priónica de caballo demostrando que es un polimorfismo “benigno”, es decir, que no afecta a la estructura de la proteína prion (Kim & Jeong, 2018). Posteriormente, los mismos autores encontraron un nuevo polimorfismo W/R101. Mediante el uso de PolyPhen-2, PROVEAN y PANTHER predijeron que este polimorfismo W/R101 podría considerarse “benigno”, “nocivo” y “posiblemente dañino”, respectivamente (Kim et al., 2020), lo que sugiere que hacen falta más estudios genéticos en esta especie.

Polimorfismos del gen *PRNP* en la especie humana:

En la especie humana se han descrito 25 mutaciones en el gen *PRNP* humano. Se observó que el genotipo en el codón 129 de la PrP^C humana tenía una importante influencia en la susceptibilidad a padecer alguna enfermedad priónica humana. Está modulado por el polimorfismo V/M129 (Collinge et al., 1991; Palmer et al., 1991). Todos los casos que se han detectado de variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) (Collinge & Clarke, 2007) y casi la totalidad de los casos de Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (iECJ) han sido homocigotos metionina en el codón 129 (M129M) (Will et al., 1999). Los experimentos realizados con ratones transgénicos han demostrado que el alelo V129 humano actúa como barrera de transmisión del agente priónico de la EEB, produciendo así alteraciones en el fenotipo de la enfermedad (Wadsworth et al., 2004).

Además, es importante indicar que la mutación que supone el cambio de prolina por leucina en el codón 102 es el más común en la enfermedad Gerstmann-Straussler syndrome (GSS) (Doh-ura et al., 1989). También cabe destacar la mutación en el codón 200 que aparece en el 70% de las personas que padecen ECJ familiar (Goldgaber et al., 1989).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las EET no se basa en la utilización de las técnicas convencionales de diagnóstico utilizadas en enfermedades provocadas por virus y bacterias, ya que no se puede emplear un método ampliamente utilizado como es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) al carecer el prion de ácidos nucleicos. Por lo tanto, el diagnóstico de las EET principalmente consiste en la detección de la PrP^{Sc} en el SNC acompañado de la observación de lesiones características.

1- Diagnóstico *in vivo*

Diagnóstico clínico

Clínicamente, resulta difícil diferenciar las EET de otras patologías nerviosas o de encefalopatías de distintos orígenes (Cockcroft, 2004). Por ello el diagnóstico clínico en las EET se considera muy poco sensible y específico, ya que resulta complejo distinguir estas enfermedades de otras patologías que presentan un cuadro clínico similar. Por lo tanto, para hacer un diagnóstico fiable de una EET, hay que tener en consideración otras enfermedades neurológicas como las encefalitis infecciosas, cetosis, toxicosis o traumatismos con las que hay que realizar un diagnóstico diferencial.

Biomarcadores diagnósticos y posibilidades de diagnóstico preclínico

Para lograr realizar el control de estas enfermedades, el diagnóstico precoz es fundamental. Por todo ello, se han descrito numerosos marcadores además de métodos de diagnóstico *in vivo* como la detección de PrP^{Sc} en los folículos linfoides del extremo distal de la mucosa rectal (Gonzalez et al., 2005), amígdalas palatinas (van Keulen et al., 1996) y en otros tejidos como el tercer

párpado (Vargas et al., 2006). Sin embargo, estas técnicas tienen una sensibilidad muy baja, y no son capaces de detectar un amplio porcentaje de casos ya que la patogenia de las enfermedades priónicas en el SLR puede variar considerablemente dependiendo de la especie, cepa priónica o genotipo del animal (Monleon et al., 2011) por lo que su uso está restringido para fines científicos.

En los últimos años, han adquirido gran importancia las herramientas genómicas, como el uso de microarrays (Ness, 2006) o la secuenciación masiva del transcriptoma (Rosenkranz et al., 2008; Wilhelm et al., 2008), las cuales permiten determinar posibles genes implicados en las enfermedades priónicas. Otros marcadores de gran importancia son las proteínas 14-3-3 y tau total en líquido cefalorraquídeo (LCR), ambos considerados como marcadores de daño neuronal (Otto et al., 2002). La cuantificación de PrP total en el LCR también es considerado un marcador, ya que en algunos casos de sECJ se ha demostrado una disminución de la misma (Abu Rumeileh et al., 2017; Dorey et al., 2015). Los marcadores Tau total, 14-3-3 y PrP total se ha demostrado que también pueden ser utilizados como marcadores en el caso del scrapie clásico (Llorens et al., 2018).

2- Diagnóstico *Post-mortem*

Examen histopatológico

Esta técnica se basa en la visualización de lesiones microscópicas características en el SNC mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H-E) (Wells & Wilesmith, 1995). Estas lesiones son principalmente la espongiosis, que suele acompañarse de gliosis, degeneración y pérdida neuronal, y en determinados

casos, amiloidosis (Wells & McGill, 1992). En el año 1989 se demostró que mediante el examen histopatológico de la médula oblongada a nivel del óbex en el ganado bovino, se detectaba al 99% de animales que presentaban lesiones compatibles con EEB (Wells et al., 1989). En el caso del scrapie en el ganado ovino no había tanta concordancia entre los diferentes individuos, ya que presentan una mayor variabilidad de lesiones, entre las que destacan: vacuolización del tronco del encéfalo, tálamo y médula espinal (Detwiler, 1992; Wood et al., 1997). En el caso del scrapie en el ganado caprino, es similar a lo observada en el ganado ovino, pero con la peculiaridad de que presentan una vacuolización de mayor intensidad (Hadlow et al., 1980).

En los seres humanos, la presencia de placas floridas, las cuales se definen como placas de amiloide unicéntricas rodeadas de un halo de vacuolas, se considera una lesión patognomónica de los casos de vECJ (Parchi et al., 2012).

En la mayoría de los casos, los perfiles lesionales no son suficientes para realizar un diagnóstico preciso y por todo ello el examen histopatológico ya no se considera el método de diagnóstico de referencia para animales presuntamente afectados por las EET.

Técnicas de detección rápida de PrP^{Sc}

En el año 2000 se puso en marcha un programa de vigilancia activa en España (RD 3454/2000) y con ello comenzaron a detectarse los diferentes casos de EET mediante los test rápidos de detección de PrP^{Sc}, principalmente la técnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Se basan en la utilización de anticuerpos específicos que se unen a la PrP^{Sc} y no a la PrP^C, o bien por las

características de resistencia de la PrP^{Sc} a las proteasas, distinguiendo así las diferentes conformaciones.

A día de hoy en el mercado existen 7 test autorizados para el diagnóstico de las EET en las especies ovina y caprina y 9 para el diagnóstico de la EEB en la especie bovina.

Detección de la PrP^{Sc} mediante la técnica de Inmunohistoquímica

La técnica de inmunohistoquímica (IHQ), es una técnica con una alta especificidad y sensibilidad, y por ello es considerada el método de diagnóstico de referencia de la OIE y por lo tanto de elección para el diagnóstico de las EET.

Esta técnica permite la detección de la PrP^{Sc} en diferentes tejidos mediante la utilización de anticuerpos anti-PrP que se unen a la PrP^{Sc} tras la eliminación de la PrP^C mediante una digestión con Proteinasa K. Además, permite diagnosticar casos que todavía no han expresado lesiones histopatológicas, ya que la acumulación de PrP^{Sc} precede a la aparición de las lesiones, y pueden ser detectadas mediante la técnica de IHQ (J. Foster et al., 1996; Miller et al., 1993; Monleón et al., 2003). No solo sirve para el diagnóstico, ya que también proporciona información sobre la localización, distribución, abundancia, y características morfológicas de los depósitos de PrP^{Sc} en los diferentes tejidos (Gonzalez et al., 2002). Gracias a ello, se pueden detectar una serie de patrones o tipos de depósito característicos y diferenciables, lo que permite discriminar distintas cepas infectantes.

Detección de la PrP^{Sc} mediante la técnica de Western Blot

La técnica de Western Blot es una de las técnicas más utilizada para la detección de la PrP^{Sc}. Es también una técnica con una alta sensibilidad y especificidad y que además permite la utilización de tejidos congelados y frescos. La técnica se basa en la digestión de la muestra mediante Proteinasa K (Pk), en la que la PrP^C se degrada completamente, mientras que, en la PrP^{Sc}, en el extremo N-terminal persiste una fracción resistente a la pK de 27 a 30 kDa. Posteriormente se lleva a cabo la electroforesis en un gel de acrilamida, de forma que la PrP^{Sc} migra y se separa en función de su peso molecular presentando un patrón típico en el que se observan tres bandas correspondientes a las tres glicofomas de esta proteína: diglicosilada, monoglicosilada y por último la no glicosilada. Seguidamente se lleva a cabo la transferencia a una membrana, que se incuba tanto con un anticuerpo anti-PrP como un anticuerpo secundario que reaccione con éste para así poder detectar las 3 bandas anteriormente citadas mediante la aplicación de un quimioluminiscente.

Al igual que ocurre en la IHQ, el Western Blot permite detectar casos positivos en animales con bajas cantidades de PrP^{Sc} y que no presentaban lesiones histopatológicas características. También permite diferenciar distintas cepas en función de la disposición de las tres bandas detectadas, la altura e intensidad de cada una de ellas y con todo ello se constituye un patrón de glicosilación particular de cada agente causal (Collinge et al., 1996; Somerville et al., 1997).

3- Técnicas de Amplificación de Priones

La técnica de la amplificación cíclica de la proteína mal plegada, conocida por sus siglas en inglés como “PMCA” (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*), (Figura 6) se creó con el objetivo de detectar concentraciones bajas del agente, en aquellas muestras de tejidos o fluidos en los cuales la PrP^{Sc} no está en cantidades lo suficientemente elevadas como para poder ser detectada por técnicas convencionales de diagnóstico (IHQ y Western Blot). La técnica consiste en poner en contacto la muestra, que contiene pequeñas cantidades de la PrP^{Sc} (“semilla”) con homogeneizados de encéfalos no infectados con una cantidad muy grande de PrP^C (“sustrato”). Posteriormente se llevan a cabo rondas sucesivas de incubación para inducir la replicación de los polímeros de PrP^{Sc} y de sonicación para romper los mismos dando lugar a multitud de nuevas semillas que replican el proceso de forma cíclica (Saborio et al., 2001).

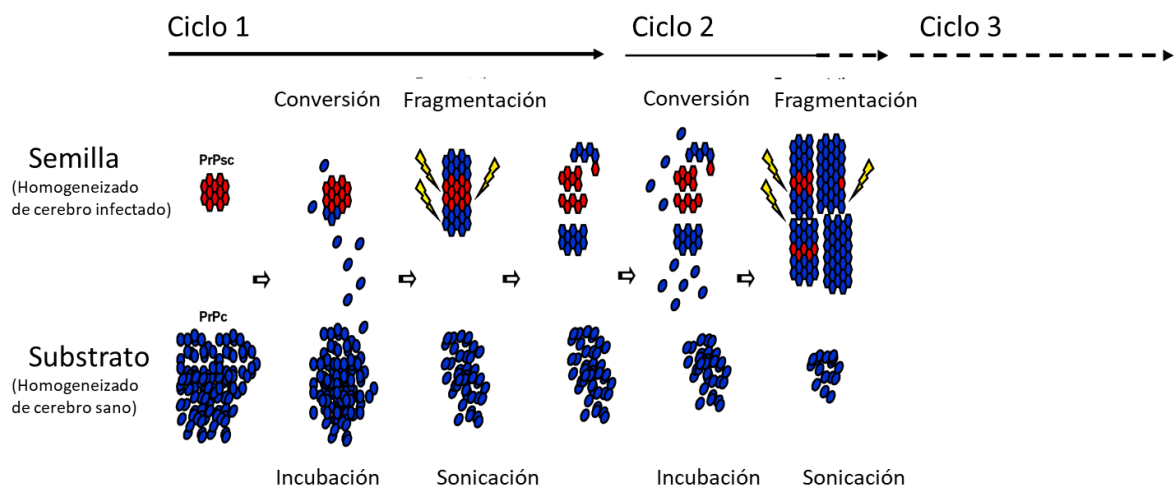


Figura 6. Fases de la técnica PMCA. Adaptada de (Levavasseur et al., 2019)

Toda la PrP^{Sc} replicada durante el proceso conserva las propiedades biológicas, estructurales y bioquímicas de la PrP^{Sc} original (Castilla et al., 2005). Por todo ello, es una técnica muy interesante ya que combinada con las técnicas convencionales para la detección de la PrP^{Sc}, proporciona una herramienta diagnóstica de gran utilidad.

4- Bioensayo

Los bioensayos en animales se utilizan ampliamente en la investigación de las enfermedades priónicas. Se trata de la técnica más sensible para la detección de priones en material potencialmente peligroso, pero posee algunas limitaciones, como, por ejemplo, la barrera de especie y especialmente los largos periodos de incubación junto con la utilización de un gran número de animales de experimentación. La aparición de cepas transgénicas de ratones supuso un gran avance en la investigación de las enfermedades priónicas, ya que ayudó a detectar el papel del gen *PRNP* del ratón en los periodos de incubación, susceptibilidad, transmisión y tipificación de diferentes cepas priónicas (Bruce & Fraser, 1991; Dickinson et al., 1968). Hoy en día, es un método con fines experimentales ampliamente utilizado en el ámbito científico.

ENFERMEDADES PRIÓNICAS Y EL SUEÑO

Las enfermedades priónicas comparten características neurodegenerativas comunes con otras enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA), la enfermedad de Parkinson (EP), la demencia con cuerpos de Lewy y la enfermedad de Huntington (EH), entre otras (Dobson, 2003). Estas enfermedades neurodegenerativas se caracterizan por la pérdida neuronal y el depósito anormal de proteínas (α -sinucleína fosforilada, tau, β -amiloide, huntingtina o PrP^{Sc}) en el sistema nervioso, principalmente en el sistema nervioso central (Scheckel & Aguzzi, 2018; Soto & Pritzkow, 2018). El origen de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas es incierto. Algunas de estas enfermedades son idiopáticas (Iranzo & Santamaria, 2015), otras son hereditarias (Frisoni et al., 2022; Tanner et al., 1999), y en el caso de las enfermedades priónicas, pueden ser esporádicas, hereditarias o adquiridas (Imran & Mahmood, 2011a).

Diversos síntomas y signos neurológicos, como demencia, parkinsonismo, debilidad motora, ataxia, síndrome cerebeloso, disautonomía o anomalías oculomotoras, son típicos de estas enfermedades, que suelen tener un curso crónico y progresivo (Braak et al., 2003; Dugger & Dickson, 2017; Malhotra, 2018). Además de todos ellos, los trastornos del sueño son muy comunes y pueden ser la primera manifestación de enfermedad, suponiendo un signo diagnóstico crucial para predecir la progresión de la misma (Hastings & Goedert, 2013; Ju et al., 2013; Kondratova & Kondratov, 2012; Lauretti et al., 2017; Lim et al., 2013; Mattis & Sehgal, 2016). Los trastornos del sueño diagnosticados en las enfermedades neurodegenerativas son: insomnio (dificultad para conciliar el sueño, fragmentación del sueño, despertar

temprano en la mañana), somnolencia diurna excesiva, cambios en el ritmo circadiano, trastorno del comportamiento del sueño de movimiento ocular rápido (REM), movimientos periódicos de las piernas en sueño, síndrome de piernas inquietas, apnea del sueño central u obstructiva y estridor nocturno (Barone et al., 2009; Dufort-Gervais et al., 2019; Hatfield et al., 2004; Morton et al., 2005; Weissova et al., 2016). Nos encontramos frente a lo que podríamos llamar la causa que más afecta a la calidad de vida de los pacientes que sufren enfermedades neurodegenerativas.

En el año 1996, surgieron las primeras investigaciones en las que relacionaban directamente la proteína prion celular (PrP^c) con los ritmos circadianos y el sueño. Se observó que había diferencias muy significativas en los periodos de sueño entre ratones desprovistos de PrP^c y ratones con PrP^c. Sugirieron que la pérdida de PrP^c conducía a una disfunción neurológica en al menos una de las enfermedades priónicas como es el insomnio familiar fatal (FFI) (Tobler et al., 1996). Se ha vuelto cada vez más evidente que la disfunción del sueño esta comúnmente acompaña a enfermedades neurodegenerativas crónicas y puede aparecer varios años antes de los principales síntomas de estos trastornos (Ju et al., 2014; Schrempf et al., 2014). Por ejemplo, el trastorno del comportamiento del sueño REM puede preceder al desarrollo de una sinucleinopatía por décadas (Postuma et al., 2013) y la reducción de la eficiencia del sueño se observa en pacientes con EA preclínica (Ju et al., 2013). Además, la creciente evidencia muestra que la interrupción del sueño puede acelerar los procesos neurodegenerativos, incluida la agregación de proteínas tóxicas en modelos preclínicos, aumentando el riesgo de desarrollar EA sintomática (Ju et al., 2013; Musiek et al., 2015; Osorio et al., 2015). Por lo tanto, comprender la relación entre la patología del sueño y las enfermedades priónicas puede mejorar nuestra comprensión de la relación

bidireccional entre el sueño y otros procesos neurodegenerativos comunes. Aunque los síntomas del sueño no se han visto tradicionalmente como un síntoma cardinal de la ECJ, recientemente en el año 2022 se observó un paciente el cual presentaba graves alteraciones del sueño REM 5 años antes de la enfermedad (El Sammak et al., 2022). En ciertos modelos animales de enfermedad priónica también se observan patrones de sueño interrumpidos; las ratas inoculadas con diversas cepas de priones han experimentado una disminución del sueño de onda lenta (Bassant et al., 1984), los monos Rhesus infectados con kuru muestran una pérdida completa del sueño REM y un sueño interrumpido o fragmentado (Bert et al., 1978), mientras que los ratones inoculados con priones murinos muestran alteraciones del período de descanso desde muy temprano en el período de incubación (Steele et al., 2007). También se ha informado que los pacientes con enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Sheinker no exhiben alteraciones del sueño (Provini et al., 2009) lo que sugiere que la disfunción del sueño es específica de cepas particulares de priones

Estudio 1: *In vitro* detection of Caprine BSE in asymptomatic PrP humanized mice after inoculation with negative goat tissues.

Abstract

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) came to the fore in the 1980s in the UK with the association of transmissible spongiform encephalopathy (TSE) in cattle and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in humans due to the consumption of beef contaminated with prion protein. The goat is the only small ruminant species in which two natural cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) have been diagnosed, suggesting a very high risk to human health that could be reduced by genetic selection of resistant animals based on their *PRNP* genotype.

The presence of lysine at codon 222 appears to have a protective effect after oral infection and prolongs the incubation period against scrapie and bovine BSE, but did not have a strong effect against caprine BSE after intracerebral exposure. This work evaluated the infectivity of goat tissues and fluids (with different genotypes at codon 222) that were negative by conventional diagnostic techniques, but previously inoculated intracerebrally with caprine BSE and bovine BSE. The tissues and fluids chosen were obex, semitendinosus muscle, triceps brachii muscle and liver, followed by fluids such as whole blood, white blood cells, cream milk, whey and milk cells. To assess human susceptibility, a line of transgenic mice expressing the methionine (M) allele of human PrP at codon 129 (Tg340) was inoculated. Mice inoculated with goat obex were positive by immunohistochemistry and western blotting, the remaining mice inoculated with other tissues and fluids were negative. Bovine and caprine BSE isolates derived from obex showed neuropathological features similar to those obtained after vCJD transmission in mice expressing human PrP. Obex-derived caprine BSE isolates show a higher transmission capacity to Tg340 mice than obex-derived bovine BSE isolates. In

relation to genotype, obex-derived caprine BSE isolates from goats homozygous for glutamine (G) at codon 222 show higher attack rates in Tg340 mice. Using PMCA, brains from IHC and WB negative mice inoculated with negative goat tissues and fluids, only a few tissues from goats infected with caprine BSE showed amplification, i.e. semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver and whole blood. Regarding the genotype of the goats, it was observed that the presence of glutamine at codon 222 implied a great peripheral distribution of the prion since amplification was detected in muscle, liver and whole blood.

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases are a set of progressive and fatal neurodegenerative pathologies caused by an unconventional aetiological agent called prion which consist only of a pathological protein called PrP^{Sc} (Prusiner, 1982). PrP^{Sc} derives from the conversion of the physiological cellular prion protein (PrP^C) and is able to propagate by recruiting more PrP^C. This conformational change confers PrP^{Sc} a greater tendency to aggregate, greater insolubility in non-ionic detergents, high resistance to heat and chemical sterilization, and partial resistance to protease digestion (Pruden et al., 2004).

TSEs have long incubation periods and are characterised by spongiform degeneration of the central nervous system (CNS), with the appearance of neuropil spongiosis, intraneuronal vacuolisation, neuronal loss and neuroinflammatory reactions of glial cells.

The first reliable records of TSEs date back to the 18th century, in 1732, when scrapie was described in sheep (McGowan, 1922). In 1942 it was also described in goats

(Chelle, 1942). In 1986, one of the most important TSEs was identified, the bovine spongiform encephalopathy (BSE) diagnosed in British cattle showing neurological signs similar to scrapie. It represented one of the most important food crises of the last decades in Europe. After numerous studies it was concluded that the only common factor present on the affected farms was the use of feed and feed supplements made from animal meal manufactured from pig, cattle, sheep and poultry carcasses (Wilesmith et al., 1988). By the late 1980s, the disease was already considered a serious problem, however, it became more important after its identification as the cause of the variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). In 1995, the first known cases of vCJD were described (Bateman et al., 1995), one year later, 10 more cases were described (Will et al., 1996) and later, in 1997, vCJD was shown to be caused by ingestion of BSE-infected bovine products (Bruce et al., 1997).

The first research aimed at identifying a genetic basis that could explain the difference in susceptibility and development of TSEs, was carried out in sheep. The VRQ / VRQ, VRQ / ARQ and ARQ / ARQ genotypes have been associated with susceptibility to scrapie, while the ARR / ARR genotype has been associated with a higher level of resistance (Belt et al., 1995; Bossers et al., 1996; Hunter, 1997; Hunter et al., 1996). Several studies of the goat *PRNP* gene have shown 17 silent mutations and more than 40 amino acid substitutions, of which at least eight appear to be associated with resistance to scrapie: G127S, I142M, H143R, S146N/ S146D, R154H, R211Q and Q222K (Bouzas et al., 2010; Goldmann et al., 2011; Serrano et al., 2009; Vaccari et al., 2009). With regard to BSE resistance in goats, few studies have been carried out, and the I/ M142 polymorphism is associated with a slight increase in incubation periods after experimental BSE inoculations (Goldmann et al., 1996). Experimental studies have been

carried out assessing the oral transmission of caprine BSE in goats carrying the R211Q and Q222K mutations; showing that while the R211Q polymorphism extends the incubation period, only the K222 allele appears to have a protective effect after oral infection (Aguilar-Calvo et al., 2015). Subsequent studies showed that the K222 polymorphism is the most protective in natural host studies, as it demonstrated a prolongation of the incubation period for scrapie and bovine BSE, but did not have a strong effect against caprine BSE after intracerebral exposure. It is therefore suggested that a programme to improve resistance against TSEs based on selection of carriers of the K222 allele could effectively prevent infection against scrapie and even BSE, but would not be effective against caprine BSE (Aguilar-Calvo et al., 2014). Twenty-five mutations have been described in the human *PRNP* gene. The genotype at codon 129 of human PrP^C was found to have a significant influence on susceptibility to human prion disease. It is modulated by the V/M129 polymorphism (Collinge et al., 1991; Palmer et al., 1991). All detected cases of variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) (Collinge & Clarke, 2007) and almost all cases of iatrogenic Creutzfeldt-Jakob (iCJD) have been homozygous methionine at codon 129 (M129M) (Will et al., 1999).

The experimental oral transmission of the BSE agent to sheep and goats (Foster et al., 1993) and the detection of two natural cases of BSE in goats. (Eloit et al., 2005; Spiropoulos et al., 2011) demonstrated that transmission of BSE to small ruminants can occur naturally. Although the risk of transmission of a TSE to humans is considered low due to the species barrier phenomenon, these data suggest that it could pose a significant risk of BSE infection in humans. In 2011, Padilla and collaborators demonstrated that BSE isolates from sheep and goats showed a higher transmission efficiency compared to bovine BSE (Padilla et al., 2011). Therefore, there is a need for

further studies to assess the potential risk of BSE infection in humans due to the consumption of products derived from small ruminants.

Our work consists of assessing the potential risk to humans of goat tissues from goats infected with BSE of bovine origin and BSE of goat origin by inoculating all these tissues into human transgenic mice expressing the amino acid methionine at codon 129 of human *PRNP*.

Materials and Methods

TSE isolates

Tissue samples from goats infected with bovine BSE and caprine BSE were used for the study. Goats expressed different genotypes at codon 222: one homozygous Glutamine/Glutamine (Q222Q), one heterozygous Glutamine/Lysine (Q222K) and one homozygous Lysine/Lysine (K222K) animal inoculated with goat second pass caprine BSE (Ca-BSE); and one homozygous Glutamine/Glutamine and one Lysine/Lysine animal inoculated with bovine BSE (Bo-BSE). The tissues chosen were obex, semitendinosus muscle, triceps brachii muscle and liver, followed by fluids such as whole blood, white blood cells, cream milk, whey and milk cells (Table 1 and 2). Samples of the different goat tissues and fluids mentioned above were stored at -80°C and used to prepare the inoculum.

Estudio 1

Table 1. Goat inocula with caprine BSE used in the bioassay

Caprine-BSE					
Genotype	Isolate	Genotype	Isolate	Genotype	Isolate
QQ	Obex	QK	Obex	KK	Obex
	Semitendinosus muscle		Semitendinosus muscle		Semitendinosus muscle
	Triceps Brachii muscle		Triceps Brachii muscle		Triceps Brachii muscle
	Liver		Liver		Liver
	Whole blood		Whole blood		Whole blood
	White blood cells		White blood cells		White blood cells

Table 2. Goat inocula with bovine BSE used in the bioassay

Bovine-BSE			
Genotype	Isolate	Genotype	Isolate
QQ	Obex	kk	Obex
	Semitendinosus muscle		Semitendinosus muscle
	Triceps Brachii muscle		Triceps Brachii muscle
	Liver		Liver
	Whole blood		Whole blood
	White blood cells		White blood cells
	milk serum		
	cream		
	milk cells		

Preparation of tissue-derived inocula

Inocula were prepared from obex, semitendinosus muscle, triceps brachii muscle and liver. From each sample, 0.5 mg of tissue were homogenised in 5 ml of physiological saline (w/v). The homogenate was filtered through a sterile gauze and 2.5 µl of antibiotic was added. The inoculums were seeded on blood agar Petri dishes and incubated at 37°C for 48 hours to check for sterility.

Preparation of blood and white blood cell inocula

Inocula were prepared as previously described (Andréoletti et al., 2012). Whole blood, plasma and red blood cell concentrate were homogenised at high speed for 90 seconds (Precess 48-Bertin, France) White blood cells corresponding to a known quantity of whole blood (10ml) were homogenised at high speed for 90 seconds (Precess 48-Bertin, France) in 5% glucose solution.

Preparation of cream milk, whey and milk cells inocula

Milk and colostrum were first diluted (1/2 for milk and 1/5 for colostrum) in PBS containing 10% acid-citrate-dextrose (C3821, Sigma-Aldrich) and 10 mM EDTA-2K and homogenized by inversion. After incubating for 30 min at 4°C, the cream was collected with a single use spatula. A Pasteur pipette was then passed through the layer of residual cream and the liquid was aspirated; this was passed through a 200 µm filter and collected in 50 ml tubes. The liquid sample was then centrifuged at 2000 rpm at 4°C for 5 minutes. The supernatant (casein-whey) was collected and stored frozen while cell pellets were transferred to a new 50 ml tube. The cells were washed three times by successive centrifugation/resuspension phases in PBS and counted in a Malassez cell

before frozen storage. To carry out a correct immunoprecipitation, the protocol outlined by Lacroux in 2008 was followed (Lacroux et al., 2008). Immunoprecipitated cream, whey and cell pellet fractions were re-suspended in 130 μ L of sterile 5% glucose before inoculation.

Mouse transmission studies

Mice of the human transgenic line Tg340, which expresses 4 times the human PrP^C and are homozygous for methionine at codon 129, were used (Padilla et al., 2011). Six animals per inoculum were inoculated. Each mouse, under isoflurane anaesthesia, received an intracerebral inoculation (20 μ l) into the right cerebral hemisphere, using a 50- μ l precision syringe and a 25-G needle. To reduce post-inoculation pain, each mouse was given a subcutaneous dose of buprenorphine (0.3 mg/kg). Following inoculation, animals were housed in cages placed in HEPA-filtered ventilated racks and monitored four times per week for onset of neurological signs of prion disease. Mice were culled by cervical dislocation when clinical signs of advanced TSE were detected (i.e. sustained kyphosis, severe ataxia, and poor body condition) or at the end of the study (700 dpi). Brains were removed immediately after euthanasia and divided sagittally. One brain hemisphere was frozen at -80°C for subsequent biochemical analyses. The other brain hemisphere was placed in 10% formalin fixative for up to 48h and used for neuropathological studies. The spleen was removed and half of it was placed in 10% formalin and the other half frozen at -80°C for further analyses. Brain homogenates from mice from the first passage were used as inoculums for the second passage.

Sample processing and histopathological evaluation

To perform histopathological studies, brains were cut at four standardized levels for the histological evaluation of the 8 following brain regions: frontal cortex (Fc), parietal cortex (Pc), hippocampus (Hc), thalamus (T), hypothalamus (Hyt), mesencephalon (Mes), cerebellum (Cbl) and medulla oblongata (Mo) (Fraser and Dickinson, 1968). Later, sections from paraffin-embedded mouse brains (4 µm thick) were cut and collected on glass slides and dried at 56 °C for 24-36 h. For the evaluation of spongiform lesions, sections were stained with haematoxylin and eosin and examined using an optical microscope (Zeiss Axioskop 40).

Histological analysis of PrP^{Sc} distribution

Immunohistochemistry was used for the detection of PrP^{Sc} in mouse brains. The standardized protocol used for the confirmation of TSE cases was applied (Monleón et al., 2003). This protocol consists of deparaffinization of samples, pre-treatment with 98% formic acid for 5 min followed by incubation with proteinase K (PK) (4µg/ml, F. Hoffmann La Roche) for 15 min. Antigen retrieval was performed with citrate buffer (pH 6.0) for 10 minutes at 96 °C and endogenous peroxidase activity was blocked using a blocking reagent (Dako Agilent) for 10 minutes. Next, sections were incubated with primary 3F4 monoclonal antibody (1:1500, EMD Millipore, MAB 1562) for 30 min at room temperature or R486 (1:8000 AHVLA, UK) overnight at 4°C. Then, samples were incubated with an enzyme-conjugated Envision polymer (Dako Agilent) for 30 minutes at room temperature and DAB (Diaminobenzidine, Dako Agilent) was used as the chromogen. Immunostaining was evaluated microscopically (Zeiss Axioskop 40) in the aforementioned brain areas.

Western Blot Analyses

The western blot technique was performed following a previously described protocol (Padilla et al., 2011). 175±20 mg of frozen brain tissue were homogenized at 10% (w/v) in a 5% glucose+H₂O_d solution using grinding tubes (Bio-Rad) and a TeSeE™ Precess 48™ homogenizer (Bio-Rad). 50 µl of this brain homogenate were diluted in 150 µl of a 10% (w/v) negative sheep brain homogenate, to obtain a 200 µl final volume. Homogenates were incubated for 10 min at 37°C with 200 µl of a 2% proteinase K solution. PrP^{res} was recovered as a pellet after addition of 200 µl of Butanol-2 and a centrifugation at 15,000× g for 7 min at 20°C. Supernatants were discarded and pellets were dried inverted over absorbent paper for 5 min. Pellets were solubilised in Laemmli buffer and samples were incubated for 5 min at room temperature, solubilised, and heated at 100°C for 5 min. Samples were then centrifuged at 20,000× g for 15 min at 20°C and supernatants were recovered and loaded on a 12% Bis-Tris Gel (Criterion XT, BioRad or NuPage, Invitrogen). Proteins were electrophoretically transferred onto PVDF membranes (Millipore). Membranes were blocked overnight with 2% BSA blocking buffer. For immunoblotting, membranes were incubated with Sha31 monoclonal antibody (1:8000) for 1 hour at room temperature. Immunocomplexes were detected incubating the membranes for 30 minutes with horseradish peroxidase conjugated anti mouse IgG (1:5000, Amersham Pharmacia Biotech) at room temperature. Immunoblots were developed with enhanced chemiluminescence ECL Plus (GE Healthcare Amersham Biosciences) using the BioSpectrum 815 Imaging System (Ultra-Violet Products Ltd).

PMCA substrate

To detect the presence of BSE prions in mouse brain samples the ultrasensitive technique Protein Misfolding Cyclic Amplification (PMCA) was used (Castilla et al., 2005). To detect amplification, TgBov mouse brains were used as substrate. This transgenic line overexpresses bovine PrP^C 8-fold (Castilla et al., 2003; Douet et al., 2014), sacrifice by CO₂ exposure. Animals were perfused using PBS+5mM EDTA, and their brains collected and immediately frozen at -80°C. The brain substrate (10% w/v brain homogenate) was prepared using a tissue grinder, homogenizing the brain tissue in PMCA buffer (PBS + NaCl 1% + 1% Triton X-100).

PMCA amplification

PMCA reactions (70 µL final volume) were seeded with 10 µL of sample to be tested (samples were obtained from brains from the tg340 mice used in the bioassay and tested at 10⁻³ dilution) each sample was tested in duplicate. PMCA reactions were then subjected to 3 amplification rounds, each comprising 96 cycles (10 s sonication, 14 min and 50 s incubation at 39.5 °C) in a Qsonica700 device. After each round, reaction products (10ul) were mixed with fresh substrate (60ul) and subjected to another round of PMCA. PMCA products were analysed by western blot technique. Immunodetection of prion protein was performed with mouse monoclonal antibody Sha31 (1:8000, SPI-Bio) and 12B2 (1:10000, Creative Biolabs') for 1 hour at room temperature and visualized using a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and chemiluminescence ECL Plus (GE Healthcare Amersham Biosciences) using the BioSpectrum 815 Imaging System (Ultra-Violet Products Ltd). PMCA rounds included a reference goat BSE sample

(10 % brain homogenate) diluted from 10^{-2} to 10^{-9} as a positive control for amplification efficiency. Unseeded negative controls were also included.

Ethics statement

All animal experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (permit number PI12/11, PI10/16, PI16/16 and PI60/21) and were carried out in accordance with the recommendations for the care and use of experimental animals and in agreement with Spanish law (R. D. 53/2013).

Results

In the study carried out at the Centre for Encephalopathies and Emerging Communicable Diseases of the University of Zaragoza, the susceptibility of the murine transgenic line tg340 (overexpressing 4-fold human PrP^C homozygous for methionine at codon 129) to BSE was assessed after an intermediate passage in goats (bovine BSE), and after a second passage in goats (caprine BSE). This transgenic line was created at CISA-INIA, Spain, generated as described in their article (Padilla et al., 2011). These animals were inoculated with positive goat tissues such as obex, and goat tissues (previously inoculated with bovine or caprine BSE) tested negative by conventional diagnostic techniques (immunohistochemistry and western blotting) such as semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver, whole blood, white blood cells, milk serum, and cream and milk cells. Transmission efficiency was assessed by the detection of clinical signs of TSE and by the presence of PrP^{RES} in the encephalon of the animals.

Obex-derived caprine BSE isolates show a higher transmission capacity to Tg340 mice than obex-derived bovine BSE isolates

Mice inoculated with obex from goats infected with BSE (either caprine or bovine) showed clinical signs such as thinness, ataxia or kyphosis at around 700 days' post-inoculation. In contrast, mice inoculated with semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver, whole blood, white blood cells, milk serum, cream and milk cells showed no apparent clinical signs.

Obex-derived caprine BSE isolates showed a higher transmission capacity than obex-derived bovine BSE showing an attack rate of 80% (14/18) compared to 40% (4/10) of mice inoculated with bovine BSE (Table 3).

Obex-derived caprine BSE isolates from goats homozygous for glutamine at codon 222 show higher attack rates in Tg340 mice

Regarding the genotype of goats, a higher attack rate (by western blot and immunohistochemistry) was observed in mice inoculated with the caprine BSE obex isolate from goats expressing homozygous glutamine (QQ) genotype at codon 222 (6/6 mice), followed by the heterozygous glutamine/lysine (QK) genotype (5/6 mice) and finally the homozygous lysine (KK) genotype (3/6 mice) (Table 3). In the case of the bovine BSE obex isolate, the attack rate of the inoculated mice was the same regardless of the goat genotype (Table 4).

Estudio 1

Table 3. Bioassay of goat tissues inoculated with caprine-BSE. Incubation period and positive rates. dpi: days post-inoculation; IHC: Immunohistochemistry; WB: Western Blot; PMCA: Protein misfolding cyclic amplification.

			Tg340 mice (1 st passage)		
	Genotype	Isolate	Survival time (dpi)(mean \pm SEM) ^a	Positive rate (WB+IHC)	Positive rate PMCA
Caprine-BSE	QQ	Obex	730	6/6	6/6
		Semitendinosus muscle	642-776	0/5	1/5
		Triceps Brachii muscle	500-710	0/5	1/5
		Liver	681-708	0/6	1/6
		Whole blood	703	0/6	2/6
		White blood cells	695-803	0/6	0/6
	QK	Obex	737 \pm 30	5/6	6/6
		Semitendinosus muscle	693-803	0/4	1/4
		Triceps Brachii muscle	700-727	0/6	2/6
		Liver	693-794	0/6	2/6
		Whole blood	700	0/6	0/6
		White blood cells	700-735	0/6	0/6
	KK	Obex	754 \pm 10	3/6	6/6
		Semitendinosus muscle	583-804	0/5	0/5
		Triceps Brachii muscle	681	0/6	0/6
		Liver	664-780	0/6	2/6
		Whole blood	744	0/6	0/6
		White blood cells	683-781	0/6	0/6

^aSurvival times are shown as mean number of days between inoculation and euthanasia \pm SEM, except when none of the inoculated mice developed clinical signs consistent with a TSE nor were found to be PrP^{Res} positive. In the latter case, the survival periods of the first and last dead animal in each group are presented.

Estudio 1

Table 4. Bioassay of goat tissues inoculated with bovine-BSE. Incubation period and positive rates. dpi: days post-inoculation; IHC: Immunohistochemistry; WB: Western Blot. PMCA: Protein misfolding cyclic amplification.

			Tg340 mice (1 st passage)		
	Genotype	Isolate	Survival time (dpi)(mean ± SEM) ^a	Positive rate (WB+IHC)	Positive rate PMCA
Bovine-BSE	QQ	Obex	737	2/5	5/5
		Semitendinosus muscle	663-779	0/6	0/6
		Triceps Brachii muscle	680	0/6	0/6
		Liver	623-700	0/6	0/6
		whole blood	585-723	0/6	0/6
		white blood cells	700-725	0/6	0/6
		milk serum	700	0/6	0/6
		cream	700	0/6	0/6
		milk cells	700	0/6	0/6
	KK	Obex	705±47	2/5	5/5
		Semitendinosus muscle	606-780	0/6	0/6
		Triceps Brachii muscle	681	0/6	0/6
		Liver	712	0/6	0/6
		white blood cells	652-703	0/6	0/6

^aSurvival times are shown as mean number of days between inoculation and euthanasia ± SEM, except when none of the inoculated mice developed clinical signs consistent with a TSE nor were found to be PrPres positive. In the latter case, the survival periods of the first and last dead animal in each group are presented.

Bovine and caprine BSE isolates showed similar neuropathological features in human PrP expressing mice

Microscopically, there were no differences between the PrP^{res} deposits found in mice inoculated with obex from goats infected with bovine BSE and caprine BSE. As shown in figure 1, large plaque-like deposits of PrP^{res} were detected throughout the brain, predominantly in the cerebral cortex, with little involvement of the cerebellum. These plaques were accompanied by surrounding vacuolisation, these neuropathological changes are termed florid plaques and are characteristic of vCJD in humans (Ironsides & Head, 2004; Will et al., 1996) (Figure 1). In the case of the rest of the inoculated samples, no transmissibility to the inoculated Tg340 mice was demonstrated by immunohistochemistry.

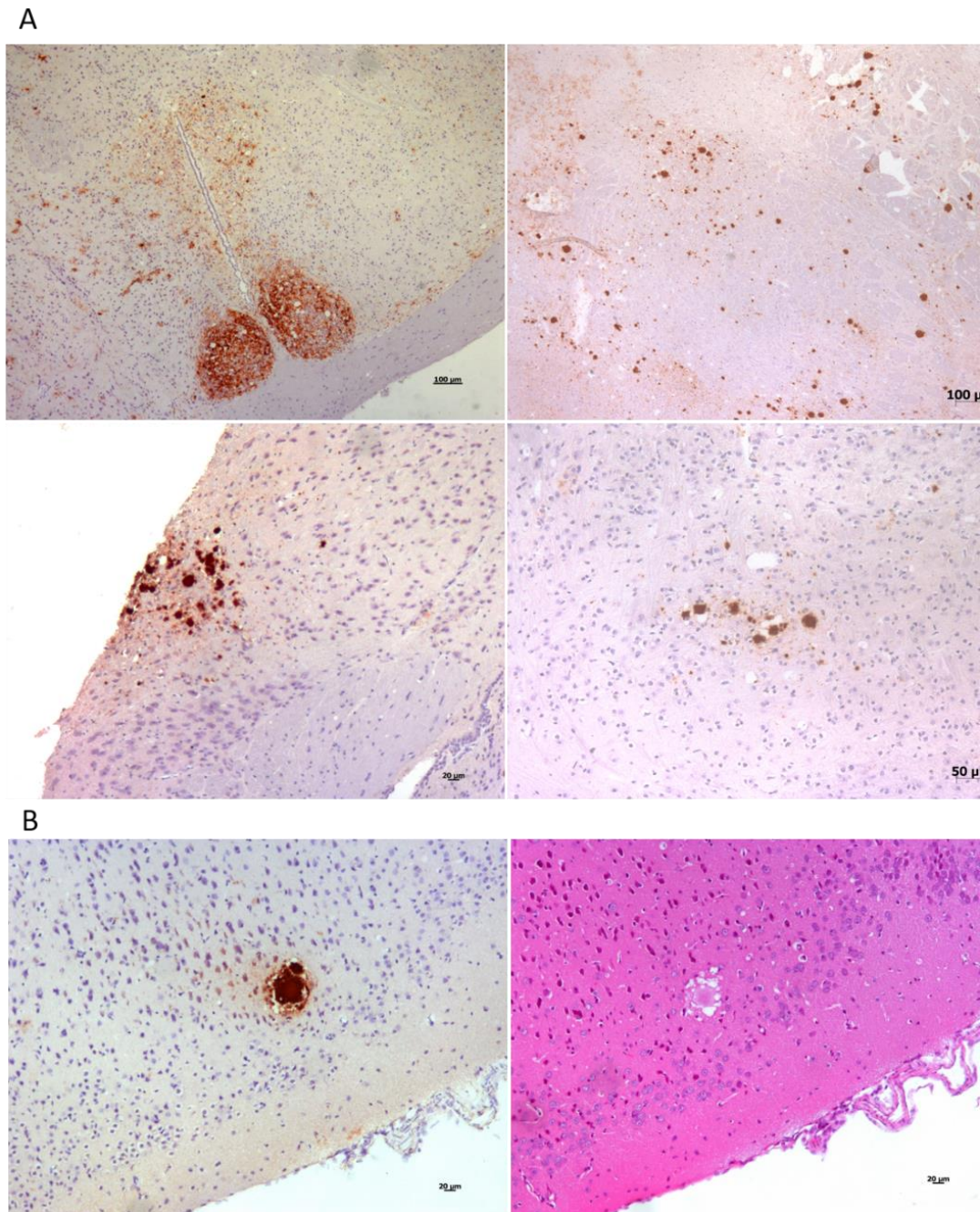


Figure 1. PrP^{res} deposits observed in Tg340 mice inoculated with caprine BSE and bovine BSE isolates. A- PrP^{res} deposition in Tg340 mice inoculated intracranially with obex from goats infected with bovine BSE and caprine BSE. 3F4 and R486 antibodies were used for immunohistochemistry. **B-** Plaque-like deposits surrounded by spongiform areas (florid plaques).

Obex-derived bovine and caprine BSE isolates showed a typical PrP^{vCJD} banding pattern

Brain PrP^{res} of Tg340 transgenic mice inoculated with obex-derived bovine and caprine BSE isolates were analysed by western blot. A typical PrP^{vCJD} banding pattern, characterized by low-size fragments (~19 kDa of the non-glycosylated fragment) and prominent diglycosylated species was consistently observed in the challenged, PrP^{res} positive mice (Figure 2). No positivity by western blot was observed in any of the mice inoculated with semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver, whole blood, white blood cells, milk serum, cream and milk cells (Figure 2).

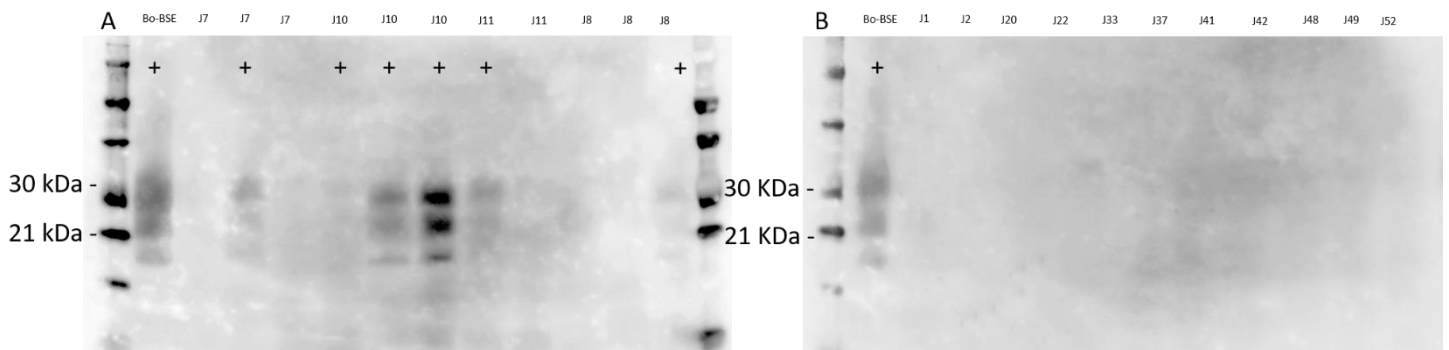


Figure 2. Western blot analyses of PrP^{res} in Tg340 mice. **A-** PrP^{res} detection in several Tg340 mice intracerebrally inoculated with goat obex with bovine BSE and caprine BSE. J7: Mice inoculated with obex from goat genotype K222K inoculated with caprine BSE. J8: Mice inoculated with obex from goat genotype K222K inoculated with bovine BSE. J10: Mice inoculated with obex from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. J11: Mice inoculated with obex from goat genotype Q222Q inoculated with bovine BSE. **B-** Absence of PrP^{res} detection in Tg340 mice intracerebrally inoculated with goat muscle, liver, whole blood, white blood cells, milk serum, cream and milk cells with bovine BSE and caprine BSE. J1: Mice inoculated with semitendinosus muscle from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J2: Mice inoculated with semitendinosus muscle from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. J20: Mice inoculated with liver from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J22: Mice inoculated with liver from goat genotype K222K inoculated with caprine BSE. J33: Mice inoculated with whole blood from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J37: Mice inoculated with whole blood from goat genotype Q222Q inoculated with bovine BSE. J41: Mice inoculated with white blood cells from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J42: Mice inoculated with white blood cells from goat genotype K222K inoculated with bovine BSE. J48: Mice inoculated with milk serum from goat genotype Q222Q inoculated with bovine BSE. J49: Mice inoculated with cream from goat genotype Q222Q inoculated with bovine BSE. J50: Mice inoculated with milk cells from goat genotype Q222Q inoculated with bovine BSE.

Tg340 negative mice inoculated with negative goat tissues show prion amplification by PMCA in TgBov substrate

PMCA reactions were seeded with a pool of brain homogenates from mice inoculated with the same inoculum. Several inoculated mice, which had been negative by western blotting and immunohistochemistry, as seen above, showed amplification by PMCA in TgBov substrate. As observed in Figure 3, these brain samples showed amplification after three rounds of PMCA. Reactions seeded with brain homogenates from non-inoculated mice did not show amplification. In addition, the reaction seeded with BSE as positive control also showed amplification.

When analysed by western blot, all isolates that were amplified showed the characteristic banding pattern of vCJD (Figure 3). To check for scrapie contamination, the membrane was first incubated with the 12B2 antibody, and we added a scrapie positive control and a BSE positive control (Figure 3, A, C). When incubated with the 12B2 antibody, only the scrapie positive control was revealed. Subsequently, the membrane was incubated with the Sha31 antibody, showing the three-band characteristic pattern of vCJD (Figure 3). Prion amplification was observed in all mice inoculated with obex with both caprine BSE and bovine BSE. In the case of tissues negative by conventional diagnostic techniques, only mouse brains inoculated with tissues from goats infected with caprine BSE showed amplification, and these were from the animals inoculated with semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver and whole blood.

In relation to goat genotype, mice inoculated with tissues from goats homozygous for glutamine (Q/Q) at codon 222 showed prion amplification in their

Estudio 1

brains after inoculation with semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver and whole blood. Mice inoculated with goat tissues heterozygous for glutamine/lysine (Q/K) at codon 222 showed prion amplification in their brains after inoculation with semitendinosus muscle, triceps brachii muscle and liver. Finally, mice inoculated with tissues from goats homozygous for lysine (K/K) at codon 222 showed prion amplification only after inoculation with liver.

Estudio 1

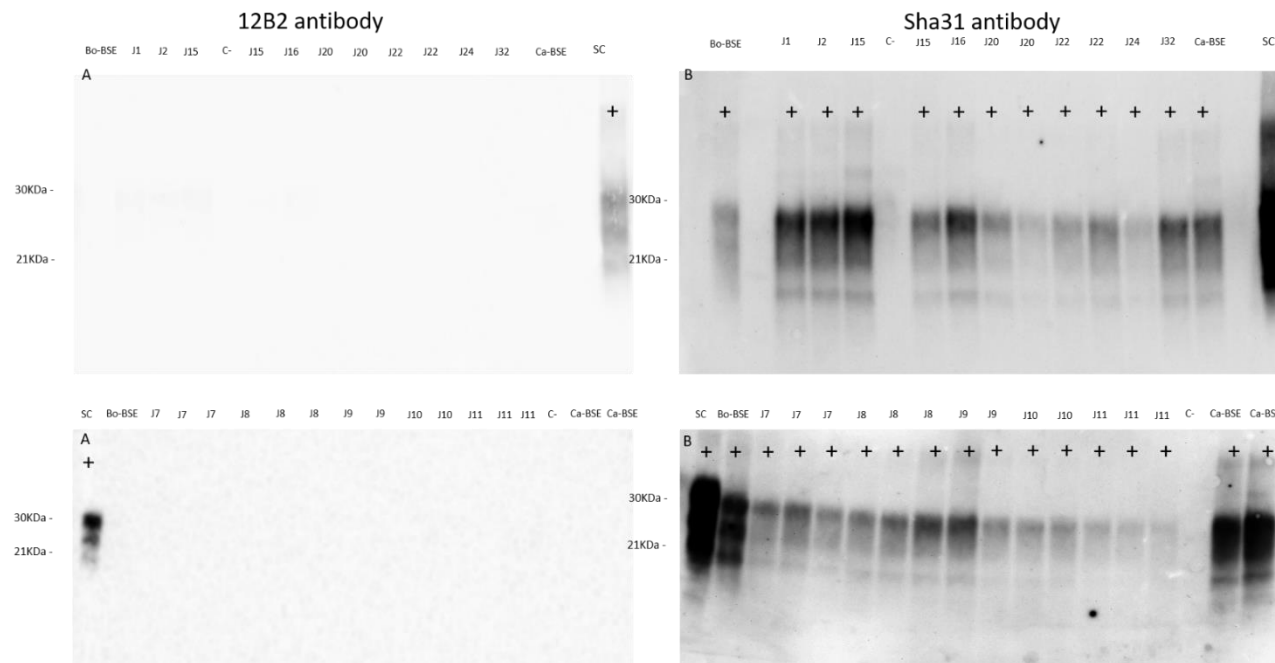


Figure 3. Biochemical analysis of Tg340 PrP^{res} obtained *in vitro* after three rounds of PMCA. A- Western blot with 12B2 antibody showing positivity only for the scrapie positive control. **B-** Western blot performed with the Sha31 antibody in which positivity is observed in all samples of mice brain amplified by PMCA, and positivity is also observed in the BSE and scrapie controls. J1: Mice inoculated with semitendinosus muscle from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J2: Mice inoculated with semitendinosus muscle from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. J15: Mice inoculated with triceps brachii muscle from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J16: Mice inoculated with triceps brachii muscle from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. J20: Mice inoculated with liver from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J22: Mice inoculated with liver from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J24: Mice inoculated with liver from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. J32: Mice inoculated with whole blood from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. **C-** Western blot with 12B2 antibody showing positivity only for the scrapie positive control. **D-** Western blot performed with the Sha31 antibody in which positivity is observed in all samples of mice amplified by PMCA, and positivity is also observed in the BSE and scrapie controls. J7: Mice inoculated with obex from goat genotype K222K inoculated with caprine BSE. J8: Mice inoculated with obex from goat genotype K222K inoculated with bovine BSE. J9: Mice inoculated with obex from goat genotype Q222K inoculated with caprine BSE. J10: Mice inoculated with obex from goat genotype Q222Q inoculated with caprine BSE. J11: Mice inoculated with obex from goat genotype Q222Q inoculated with bovine BSE.

Discussion

Among TSEs affecting goats, BSE poses the greatest risk to humans, due to its zoonotic nature. Scrapie in goats has been known since the middle of the 20th century (Chelle, 1942), but there was no real concern until the description of a case of caprine BSE in France (Eloit et al., 2005). The availability of genetic data and the numerous studies for the K222 polymorphism demonstrated a prolongation of the incubation period for scrapie and bovine BSE, but did not have a strong effect against caprine BSE after intracerebral exposure (Aguilar-Calvo et al., 2014). In this study, the infectivity of goat tissues and fluids (with different genotypes at codon 222) inoculated intracerebrally with goat and bovine BSE that tested negative in conventional diagnostic techniques was evaluated in a bioassay in human Tg340 transgenic mice.

Obex isolates containing caprine BSE prions showed a higher transmission capacity to the Tg340 model than those containing bovine BSE prions. This was demonstrated in a 2011 study comparing the transmission characteristics of bovine, ovine and caprine BSE prions in two different models of transgenic mice expressing human PrP (lines Tg650 and Tg340) (Padilla et al., 2011). This fact has also been described by numerous authors and suggests a very strong but not total transmission barrier (Asante et al., 2002; Bishop et al., 2006; Kong et al., 2008). This barrier for BSE transmission between humans and cattle could be an explanation for the low incidence of vCJD, considering the high number of people who were exposed to the BSE agent during the 1980s.

In the case of caprine BSE, attack rates in this study were around 100% as described in 2011 by Padilla when inoculating Tg340 and Tg650 mice (Padilla et al.,

2011). These data suggest a lower or no apparent transmission barrier for caprine BSE in human PrP transgenic mice.

Regarding neuropathological features, Tg340 mice inoculated with caprine and bovine BSE isolates showed a similar PrP^{res} distribution to that observed in the brains of humanized mice infected with vCJD (Béringue et al., 2008). In terms of biochemical characteristics (glycoform ratio and molecular weight of the non-glycosylated band), bovine and caprine BSE isolates showed a typical PrP^{vCJD} banding pattern, characterised by low size fragments and prominent diglycosylated species (Beringue et al., 2008).

Concerning the genotype of the goats from which the inocula derived, it is noteworthy that obex inocula with caprine BSE from goats homozygous for glutamine (Q/Q) at codon 222 showed a higher attack rate than obex inocula with caprine BSE from heterozygous glutamine/lysine (Q/K) and homozygous lysine (K/K) goats. Numerous studies confirm the importance of the K222 polymorphism in terms of resistance to prion diseases. Lacroux in 2014 demonstrated a strong resistance to scrapie via the oral route (Lacroux et al., 2014). In the same year, Aguilar-Calvo showed in a study with transgenic mice carrying the Q222 allele, a total susceptibility to scrapie and BSE infection, while mice expressing the K222 allele were resistant to all bovine BSE and scrapie isolates, being susceptible only to the caprine BSE isolate (Aguilar-Calvo et al., 2014).

Except for the obex-derived inocula, no PrP^{res} was found using conventional detection techniques in either the inoculated tissues nor the brains of inoculated mice. However, using PMCA, prion amplification was detected in brains from subclinical Tg340 mice inoculated with negative goat tissues by conventional diagnostic techniques. Only

brains from mice inoculated with negative tissues from goats infected with caprine BSE showed prion amplification by PMCA, in contrast to those inoculated with negative tissues from goats infected with bovine BSE. All this supports the view that the transmission efficiency of BSE prions to humans is increased by an intermediate pass in goats (Padilla et al., 2011).

The highest number of positive animals detected by PMCA was shown in mice inoculated with tissues from goats homozygous for glutamine (Q/Q) at codon 222 followed by those inoculated with heterozygous glutamine/ lysine (Q/K) and finally by those inoculated with homozygous lysine (KK) isolates. In the case of goats expressing the Q222Q genotype, a greater peripheral distribution of prions was detected, as prion amplification was detected in mice inoculated with semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver and also in whole blood. Goats expressing Q222K and K222K genotypes showed less widespread peripheral distribution of prions since a smaller number of inocula lead to positivity in mice. These differences could be associated with interactions between the infectious agent and specific factors of the host, being the genotype for the *PRNP* gene one of these factors. As demonstrated in sheep with scrapie, *PRNP* genotype strongly influences the tropism and distribution of PrP deposits. Sheep with susceptible genotypes show a more widespread peripheral distribution of PrP^{res} compared to sheep with resistant genotypes (Andréoletti et al., 2000; Ersdal et al., 2003; González et al., 2012; Jeffrey et al., 2002). In the case of goats expressing methionine at codon 142, they show a lower incidence of scrapie infection and a lower tendency to accumulate PrP^{res} outside the brain compared to isoleucine homozygotes (González et al., 2009).

It is true that, as no accumulation of PrP^{res} detected by conventional diagnostic techniques nor signs of disease were found in mice, the detection of PrP^{res} found by PMCA could be due to the amplification of PrP^{res} contained in the inocula used in the bioassay. However, this finding could be also due to the transmission barrier being breached in Tg340 mice. When testing brains from mice inoculated with negative tissues such as semitendinosus muscle, triceps brachii muscle and liver, followed by fluids such as whole blood, white blood cells, cream, serum and milk cells, only those coming from mice inoculated with caprine BSE, showed prion amplification after PMCA. On the other hand, brains from bovine BSE infected mice showed no amplification. As mentioned above, caprine BSE has a greater capacity for transmission to human transgenic murine models, so a true transmission of caprine BSE to tg340 mice could have occurred. To elucidate whether there was a real accumulation of PrP^{res} in the brains of Tg340 mice, inocula used in the bioassay are currently being tested by PMCA and a bioassay using brains from all PMCA-positive animals as inoculums is being carried out in Tg340.

In 2005, the first case of BSE was detected naturally in goats (Eloit et al., 2005), a study in 2011 showed that caprine and ovine BSE had a higher transmission capacity than bovine BSE (Padilla et al., 2011), therefore, our main objective was to determine the risk of human exposure to BSE of caprine and bovine origin through the consumption of potentially contaminated goat meat and dairy products.

In conclusion, our work suggests that the possibility that a small ruminant BSE prion is the causative agent of vCJD cannot be ruled out, which has important implications for animal and public health policy. Our work confirms the high transmission capacity of caprine BSE compared to bovine BSE. Furthermore, the

genotype of goats appears to play a key role in terms of the transmission barrier to humanised mice and in terms of peripheral distribution in different goat tissues. Therefore, the continuation of breeding programmes for the K222 allele in goats is of great importance.

References

- Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J. C., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A., Alamillo, E., Miranda, A., Prieto, I., Bossers, A., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2014). Role of the goat K222-PrPC polymorphic variant in prion infection resistance. *Viol. J.*, *88*(5), 2670-2676.
- Aguilar-Calvo, P., Fast, C., Tauscher, K., Espinosa, J. C., Groschup, M. H., Nadeem, M., Goldmann, W., Langeveld, J., Bossers, A., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2015). Effect of Q211 and K222 PRNP Polymorphic Variants in the Susceptibility of Goats to Oral Infection With Goat Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Infect Dis*, *212*(4), 664-672. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv112>
- Andréoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J.-M., & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrPSc in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol*, *81*(12), 3115-3126.
- Andréoletti, O., Litaïse, C., Simmons, H., Corbière, F., Lugan, S., Costes, P., Schelcher, F., Vilette, D., Grassi, J., & Lacroux, C. (2012). Highly efficient prion transmission by blood transfusion. *PLoS Pathog*, *8*(6), e1002782.
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A. L., Welch, J., Hill, A. F., Lloyd, S. E., & Wadsworth, J. D. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J*, *21*(23), 6358-6366.
- Bateman, D., Hilton, D., Love, S., Zeidler, M., Beck, J., & Collinge, J. (1995). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet (British edition)*, *346*(8983), 1155-1156.
- Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, *76* (Pt 3), 509-517. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-3-509>
- Beringue, V., Herzog, L., Reine, F., Le Dur, A., Casalone, C., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2008). Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg Infect Dis*, *14*(12), 1898-1901. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080941>
- Béringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haïk, S., Vilotte, J.-L., Fontés, M., & Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLoS one*, *3*(1), e1419.
- Bishop, M., Hart, P., Aitchison, L., Baybutt, H., Plinston, C., Thomson, V., Tuzi, N. L., Head, M., Ironside, J., & Will, R. (2006). Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol*, *5*(5), 393-398.
- Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B., & Smits, M. A. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, *77* (Pt 10), 2669-2673. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2669>
- Bouzalas, I. G., Dovas, C. I., Banos, G., Papanastasopoulou, M., Kritas, S., Oevermann, A., Papakostaki, D., Evangelia, C., Papadopoulos, O., Seuberlich, T., & Koptopoulos, G. (2010). Caprine PRNP polymorphisms at codons 171, 211, 222 and 240 in a Greek herd and their association with classical scrapie. *J Gen Virol*, *91*(Pt 6), 1629-1634. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017350-0>
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, *389*(6650), 498-501. <https://doi.org/10.1038/39057>
- Castilla, J., Gutiérrez Adán, A., Brun, A., Pintado, B., Ramirez, M., Parra, B., Doyle, D., Rogers, M., Salguero, F., & Sanchez, C. (2003). Early detection of PrP res in BSE-infected bovine PrP transgenic mice. *Arch. Virol*, *148*, 677-691.

- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, *121*(2), 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.011>
- Chelle, P. (1942). A case of trembling in the goat. *Bull Acad Vet France*, *15*, 294-295.
- Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. <https://doi.org/10.1126/science.1138718>
- Collinge, J., Palmer, M. S., & Dryden, A. J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, *337*(8755), 1441-1442. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93128-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93128-v)
- Douet, J. Y., Zafar, S., Perret-Liaudet, A., Lacroux, C., Lugan, S., Aron, N., Cassard, H., Ponto, C., Corbière, F., & Torres, J. M. (2014). Detection of infectivity in blood of persons with variant and sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Emerg. Infect. Dis*, *20*(1), 114.
- Eloit, M., Adjou, K., Culpier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F., & Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, *156*(16), 523-524. <https://doi.org/10.1136/vr.156.16.523-b>
- Ersdal, C., Ulvund, M., Benestad, S., & Tranulis, M. (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet. Pathol*, *40*(2), 164-174.
- Foster, J. D., Hope, J., & Fraser, H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, *133*(14), 339-341. <https://doi.org/10.1136/vr.133.14.339>
- Goldmann, W., Martin, T., Foster, J., Hughes, S., Smith, G., Hughes, K., Dawson, M., & Hunter, N. (1996). Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol*, *77* (Pt 11), 2885-2891. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2885>
- Goldmann, W., Ryan, K., Stewart, P., Parnham, D., Xicohtencatl, R., Fernandez, N., Saunders, G., Windl, O., Gonzalez, L., Bossers, A., & Foster, J. (2011). Caprine prion gene polymorphisms are associated with decreased incidence of classical scrapie in goat herds in the United Kingdom. *Vet Res*, *42*, 110. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-110>
- González, L., Jeffrey, M., Dagleish, M. P., Goldmann, W., Sisó, S., Eaton, S. L., Martin, S., Finlayson, J., Stewart, P., & Steele, P. (2012). Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-PRNP genotype experimental transmissions with natural sources. *Vet. Res*, *43*, 1-13.
- González, L., Martin, S., Sisó, S., Konold, T., Ortiz-Peláez, A., Phelan, L., Goldmann, W., Stewart, P., Saunders, G., & Windl, O. (2009). High prevalence of scrapie in a dairy goat herd: tissue distribution of disease-associated PrP and effect of PRNP genotype and age. *Vet. Res*, *40*(6).
- Hunter, N. (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, *5*(8), 331-334. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(97\)01081-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)01081-0)
- Hunter, N., Foster, J. D., Goldmann, W., Stear, M. J., Hope, J., & Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, *141*(5), 809-824. <https://doi.org/10.1007/BF01718157>
- Ironside, J., & Head, M. (2004). Neuropathology and molecular biology of variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Mad Cow Disease and Related Spongiform Encephalopathies*, 133-159.
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M., & Gonzalez, L. (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J. Comp. Pathol*, *127*(4), 264-273.
- Kong, Q., Zheng, M., Casalone, C., Qing, L., Huang, S., Chakraborty, B., Wang, P., Chen, F., Cali, I., & Corona, C. (2008). Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *Virol. J.*, *82*(7), 3697-3701.

- Lacroux, C., Perrin-Chauvineau, C., Corbière, F., Aron, N., Aguilar-Calvo, P., Torres, J. M., Costes, P., Brémaud, I., Lugan, S., & Schelcher, F. (2014). Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats. *Virology*, *88*(5), 2406-2413.
- Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillat, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbière, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., & Andreoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, *4*(12), e1000238. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000238>
- McGowan, J. (1922). Scrapie in sheep. *Scott J Agric*, *5*, 365-375.
- Monleón, E., Monzón, M., Hortells, P., Vargas, A., & Badiola, J. J. (2003). Detection of PrP^{Sc} in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, *51*(1), 15-18.
- Padilla, D., Beringue, V., Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Laude, H., & Torres, J. M. (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog*, *7*(3), e1001319. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001319>
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, *352*(6333), 340-342. <https://doi.org/10.1038/352340a0>
- Pruden, S., McAllister, M., Schultheiss, P., O'toole, D., & Christensen, D. (2004). Abomasal emptying defect of sheep may be an acquired form of dysautonomia. *Vet. Pathol*, *41*(2), 164-169.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Serrano, C., Hammouchi, M., Benomar, A., Lyahyai, J., Ranera, B., Acin, C., el Hamidi, M., Monzon, M., Badiola, J. J., Tligui, N., Zaragoza, P., & Martin-Burriel, I. (2009). PRNP haplotype distribution in Moroccan goats. *Anim Genet*, *40*(4), 565-568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01873.x>
- Spiropoulos, J., Lockey, R., Sallis, R. E., Terry, L. A., Thorne, L., Holder, T. M., Beck, K. E., & Simmons, M. M. (2011). Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerg. Infect. Dis*, *17*(12), 2253.
- Vaccari, G., Panagiotidis, C. H., Acin, C., Peletto, S., Barillet, F., Acutis, P., Bossers, A., Langeveld, J., van Keulen, L., Sklaviadis, T., Badiola, J. J., Andreoletti, O., Groschup, M. H., Agrimi, U., Foster, J., & Goldmann, W. (2009). State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res*, *40*(5), 48. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009031>
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, *123*(25), 638-644. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3218047>
- Will, R. G., Cousens, S. N., Farrington, C. P., Smith, P. G., Knight, R. S., & Ironside, J. W. (1999). Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, *353*(9157), 979. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01160-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01160-5)
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, *347*(9006), 921-925. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)91412-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)91412-9)

Estudio 2: Novel polymorphisms in the prion protein gene (*PRNP*) and stability of the resultant prion protein in different horse breeds

El texto que se describe a continuación corresponde con el artículo publicado en la revista científica *Veterinary research*.

Sola D., Artigas R., Mediano D.R., Zaragoza P., Badiola J.J,

Martín-Burriel I., Acín C., (2023)

Doi: 10.1186/s13567-023-01211-8

Abstract

Prion diseases are fatal neurodegenerative disorders in which the main pathogenic event is the conversion of the cellular prion protein (PrP^C) into an abnormal and misfolded isoform known as PrP^{Sc}. Most prion diseases and their susceptibility and pathogenesis are mainly modulated by the *PRNP* gene. Mutations and polymorphisms in the *PRNP* gene can alter the amino acid sequence of PrP^C, leading to a change in transmission efficiency depending on the place where it occurs. Horses are animals that are considered to be highly resistant to prions. Several studies have attempted to identify polymorphisms in the *PRNP* gene that explain the reason for this high resistance. In this study we have analyzed 207 horses from 20 different breeds, discovering 3 novel *PRNP* polymorphisms. By using computer programmes such as PolyPhen-2, PROVEAN, PANTHER, Meta-SNP and PredictSNP we have predicted the possible impact that these new polymorphisms would have on the horse prion protein. In addition, we measured the propensity for amyloid aggregation using AMYCO and analyzed the lack of hydrogen bridges that these changes would entail together with their electrostatic potentials using Swiss-PdbViewer software, showing that an increased amyloid propensity could be due to changes at the level of electrostatic potentials.

Keywords: prion disease; Prions; transmissible spongiform encephalopathy; *PRNP*; polymorphisms; horse.

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prion diseases are a group of neurodegenerative diseases, with fatal outcome, caused by a conformational change of the cellular prion protein (PrP^C), being transformed into the pathogenic form PrP^{Sc}. Prion diseases affect humans as well as domestic and wild animals. Sixteen different prion diseases have been described, seven in animals and nine in humans (Imran & Mahmood, 2011; Mead et al., 2019). In the case of animal diseases, the main ones are scrapie in sheep and goats, chronic wasting disease in cervids and the most relevant of all due to its zoonotic nature, bovine spongiform encephalopathy (BSE). BSE cases were observed in wild ungulates, primates and felines due to consumption of feed containing ruminant meat and bone meal, beef or having been in close proximity to BSE-infected cattle (Kirkwood et al., 1993; Kirkwood & Cunningham, 1994; Sigurdson & Miller, 2003). Despite the wide variety of hosts, to date, prion diseases have not been detected in horses.

It has been recognized that polymorphisms of the *PRNP* gene are responsible for some element of susceptibility or resistance to prion diseases (Bossers et al., 1997). In humans, codons 129 and 219 are very important in terms of susceptibility to prion diseases (Collinge et al., 1991; Jeong et al., 2005; Kovacs et al., 2000) also G127V and E219K have significant protective or modifying effects in acquired or sporadic diseases (Mead et al., 2019; Watson et al., 2021). More than 65 polymorphisms in the PrP^C sequence have been reported (Meydan et al., 2012), although most appear to have no effect on scrapie susceptibility. However, polymorphisms at codons 136, 154 and 171 are determinant (Goldmann et al., 1994). Of the possible variants, the genotypes

136V154R171Q / 136V154R171Q, 136V154R171Q / 136A154R171Q and 136A154R171Q / 136A154R171Q have been associated with scrapie susceptibility, while the 136A154R171R / 136A154R171R genotype has been associated with a higher level of resistance to scrapie (Belt et al., 1995; Bossers et al., 1996; Hunter, 1997; Hunter et al., 1996). On the other hand, susceptibility to atypical scrapie is linked to codon 141 (Goldmann, 2008; Moum et al., 2005). In the case of goats, various studies of the *PRNP* gene have shown 17 silent mutations and more than 40 amino acid substitutions, of which at least eight appear to be associated with scrapie resistance: G127S, I142M, H143R, N146S/ N146D, R154H, R211Q, and Q222K (Bouzalas et al., 2010; Goldmann et al., 2011; Serrano et al., 2009; Vaccari et al., 2009). Current data suggest that the S146 and K222 confer each strong, if not complete, resistance to classical scrapie infection (Barillet et al., 2009; Cinar et al., 2018; Curcio et al., 2016; Papasavva-Stylianou et al., 2017). Other studies showed that the K222 polymorphism also demonstrated a prolongation of the incubation period against bovine BSE, but did not have a strong effect against caprine BSE after intracerebral exposure (Aguilar-Calvo et al., 2014).

Several studies in deer have shown an association between polymorphisms in the *PRNP* gene and the modulation of chronic wasting disease. The first polymorphism described as protective of the disease was M132L and was discovered in the Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*). (O'Rourke et al., 1999) Recent studies suggest a lower susceptibility to CWD with the L132 polymorphism (Haley et al., 2020; Monello et al., 2017). Subsequently, mule deer (*Odocoileus hemionus*) homozygous for serine at codon 225 (S225) were found to have an increased susceptibility to CWD infection (Jewell et al., 2005). Other studies have described numerous polymorphisms that affect susceptibility to this disease. The polymorphisms G65E, Q95H, G96S and A116G have

been detected in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) (Heaton et al., 2003; O'Rourke et al., 2004) the latter three being associated with a lower susceptibility to CWD (Johnson et al., 2003; Johnson et al., 2006; O'Rourke et al., 2004). Other polymorphisms have been described in non-American cervid species, such as in the European elk (*Alces alces*) where the K109Q polymorphism was identified, in the reindeer (*Rangifer t. tarandus*) the N176D and S225Y polymorphisms and finally in the hyrax (*Dama dama*) the Q226E polymorphism (Wik et al., 2012). In dogs, resistance to BSE and CWD has been attributed to the presence of two negatively charged amino acids, D163 and E163. This variant is characteristic of the canid family (Stewart et al., 2012). This misfolding resistance has recently been experimentally demonstrated in a mouse model expressing dog prion protein (PrP) (Vidal et al., 2020).

There are few studies about the genetic variability of the *PRNP* gene in horses. Kim and Jeong detected a single nucleotide polymorphism (SNP), c.525C> A (N175K) at the *PRNP* coding region of 201 Thoroughbred horses (Kim & Jeong, 2018). More recently, analyzing the same gene region in Jeju and Halla horses, four mutations including a two synonymous SNP (c.-3A>G and c.570G>A) and one nonsynonymous SNPs (c.301T> A (W101R), have been detected (Y. C. Kim et al., 2020). So far, the polymorphisms of the equine *PRNP* gene has been only analyzed in three horse breeds, what suppose that the polymorphism of this gene in other equine populations is still unknown.

The objective of this work was to analyze the variability of the *PRNP* gene coding region in horses of 20 different breeds, evaluating “*in silico*” the effect of the polymorphisms detected and the propensity to develop amyloid peptide aggregation.

Materials and methods

Animal Samples

This study includes genomic DNA from 207 animals, including 20 breeds (Thoroughbred (N=48), Pura raza española (N=30), Burguete (N=29), Jaca Navarra (N=21), Standardbred (N=18), Quarter Horse (N=11), Nooitgedacht (N=8), Westphalian (N=8), Arabian (N=7), Italian trotter (N=5), Swedish Warmblood (N=4), Selle Francais (N=4), Oldenburg (N=3), Hanoverian (N=3), Haflinger (N=2), Paint (N=2), Appaloosa (N=1), Percheron (N=1), Wurttenberger (N=1), Basuto pony(N=1). These are unrelated animals from the DNA bank of the genetic laboratory of the University of Zaragoza, which belong to different distant regions and were obtained in different years from 2005 to 2019. These are animals from the DNA bank of LAGENBIO laboratory of the University of Zaragoza and from the ISAG (International Society for Animal Genetics) horse comparison test.

Genetic analysis:

The open reading frame (ORF) of *PRNP* gene (768 bp) was amplified from the genomic DNA with forward (*PRNP-F*: GGACACTGACACCCTCTTCATTTT) and reverse (*PRNP-R*: AAGGCCATCCTCATCCCACT) gene-specific primers. The PCR amplification was performed in a final volume of 50 µl, using the QIAGEN® Taq PCR Core Kit, according to the manufacturer's protocol. The reaction contained 20 pmol of each primer, 5 µl of 10x PCR Buffer, 10 µl of 5x Q-Solution Buffer, 1 µl of dNTP mix (10 mM), 2.5 U of Taq DNA polymerase and 5ul of 80 ng/µl DNA. DNA amplification was performed using an S-1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA) under the following thermocycling program conditions: denaturation at 94 °C for 2 min, 35 amplification cycles of denaturation at 94 °C for 45 s, annealing at 60 °C for 45 s, and extension at 72 °C for 1

min 30 s; followed by a final 10 min extension at 72 °C. Amplicons were analyzed by electrophoresis on a 1.0 % agarose and purified using the vacuum manifold from Millipore® at 24mm Hg of pressure for 3 minutes. PCR-amplified fragments on both strands were sequenced by the-company Stab-Vida (Portugal) and the chromatograms were analyzed using Chromas 2.6.6. (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Evaluation of the biological impact of nonsynonymous SNPs to horse prion protein:

The potential impact of nonsynonymous SNP to horse prion protein was evaluated by

Polyphen-2	(Polymorphism	Phenotyping	v2)
http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/index.shtml ,		PANTHER	17.0

<http://www.pantherdb.org/>, and PROVEAN web server (Protein Variation Effect Analyzer) http://provean.jcvi.org/seq_submit.php. Polyphen-2 is a program that

predicts the possible impact of an amino acid substitution on the structure and function of a protein using straightforward physical and comparative considerations. As a result of this program, three types of predictions can be obtained depending on the resulting score your score (0.0 to 1.0): “Benign”, “Possibly damaging”, and “Probably damaging” (Adzhubei et al., 2013). PANTHER estimates the probability of a particular nonsynonymous (amino-acid changing) coding SNP to cause a functional impact on the protein. It calculates the length of time (in millions of years -my-) a given amino acid has been preserved to the protein of interest. Depending on its “preservation time”, three results can be obtained: If the preservation time is above 450 my, the amino-acid changing could be “probably damaging”, if the preservation time is between 200my and 450my, the amino-acid changing could be “possibly damaging”, and finally if the preservation time is below 200my, the amino-acid changing could be “probably benign”

(Tang & Thomas, 2016). PROVEAN is a web tool that predicts whether an amino acid substitution or indel has an impact on the biological function of a protein. Two types of results can be obtained depending on the resulting score: If the score is below -2.5 the variation effect is considered “neutral”, however, if the score is above -2.5, the variation effect is considered “deleterious” (Choi & Chan, 2015). To evaluate the results, PredictSNP, a consensus software that assigns a combined score taking into account the scores obtained in other programmes such as MAPP, nsSNPAnalyzer, PANTHER, PolyPhen, PhD-SNP, SIFT, SNAP, was used (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/predictsnp1/>) (Bendl et al., 2014). Another consensus software used is Meta-SNP which integrates four existing methods: PANTHER, PhD-SNP, SIFT and SNAP (<https://snps.biofold.org/meta-snp/index.html>) (Capriotti et al., 2013).

Assessment of amyloid propensity:

To assess the amyloid propensity of the horse prion protein depending on the genetic polymorphisms, the AMYCO software was used. It utilizes an algorithm to predict amyloid fibril propensity from amino acid sequences (Iglesias et al., 2019).

Statistical analysis:

Genotype, allele, haplotype frequencies, Hardy-Weinberg equilibrium (breeds $n > 10$), and linkage disequilibrium (D' and r^2) according Lewontin (Lewontin, 1988) were calculated using the open software SHEsis (Shi & He, 2005) available at <http://analysis.bio-x.cn>. D' is the normalisation of the disequilibrium coefficient (D), its value ranges from -1 to 1, the higher the absolute value of D' , the greater the strength of linkage between loci. On the other hand, r^2 is squared correlation between allelic values at two loci, the higher the value of r^2 the greater the strength of linkage

(Lewontin, 1988). The frequency of Haplotypes 1 (Ht1) and 2 (Ht2) was measured by X2 test using GraphPad Prism version 8.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

Haplotype network and 3d modeling of the horse prion protein:

The haplotype network was built using the NETWORK 4.5.1 software (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) using the "Median-Joining" algorithm (Bandelt et al., 1999), which relates in parsimoniously forms a data set on a single network.

Analysis of the effect of non-synonymous SNPs on prion structure was performed using Swiss-PdbViewer V4.1 software (<https://spdbv.vital-it.ch/>). Models for K175N and V182I amino acid changes were generated using the 3D model of horse PrP^C obtained from the Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/structure/2KU4>). The prediction of hydrogen bonds was made according to Kim and collaborators (D.-J. Kim et al., 2020). Those predicted hydrogen bonds in the range of 1.2 to 2.76 Å from a "compatible" donor atom were considered. Using the surface charges of the exposed amino acids of the protein, the electrostatic potential was calculated using the Poisson-Boltzmann equation (Jo et al., 2022).

Results:

Depending on the species, this gene consists of 1, 2 or 3 exons. 1 for non-human primates, rabbits and birds, 2 for humans and horses and 3 for mice, sheep and cattle. The open reading frame is contained entirely in the last exon. To investigate the genetic variation in the coding sequence of the horse *PRNP* gene, we performed a PCR amplification of exon 2 (836pb), which contains the full-length ORF (open reading frame), in a total of 207 horses of 20 breeds. Direct sequencing of the amplicons revealed seven SNPs (Figure 1). Except for four previously reported polymorphism (-3A>G, 301T>A (W101R), 525C>A (N175K) and 570G>A), we detected three novel variations: one synonymous SNPs (237T>C) and two nonsynonymous (5T>G (V2G), 544G>A (V182I)) (Figure 2).

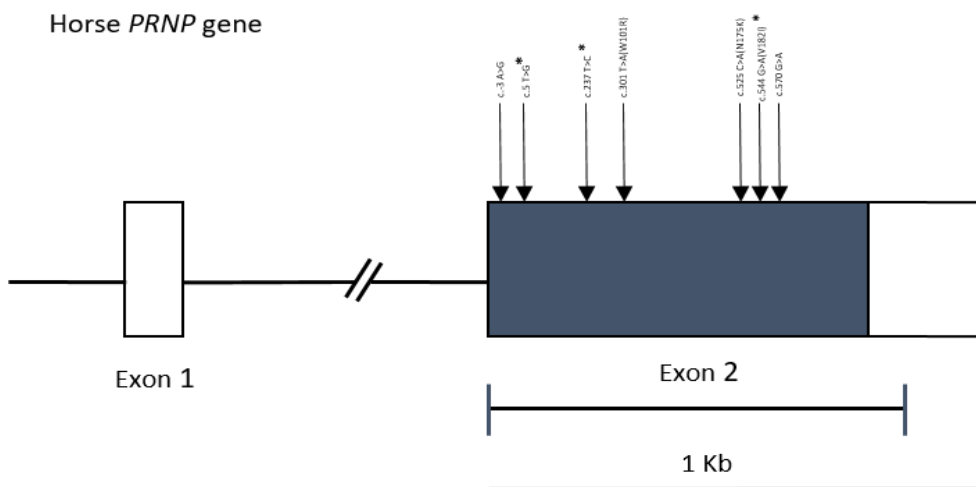


Figure 1. Schematic representation of equine *PRNP* gene. The open reading frame (ORF) within the exons is indicated by shaded blocks, and the 5' and 3' untranslated regions (UTRs) are indicated by white blocks. Arrows indicate all described polymorphisms. Asterisks denote novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) found in this study.

Estudio 2

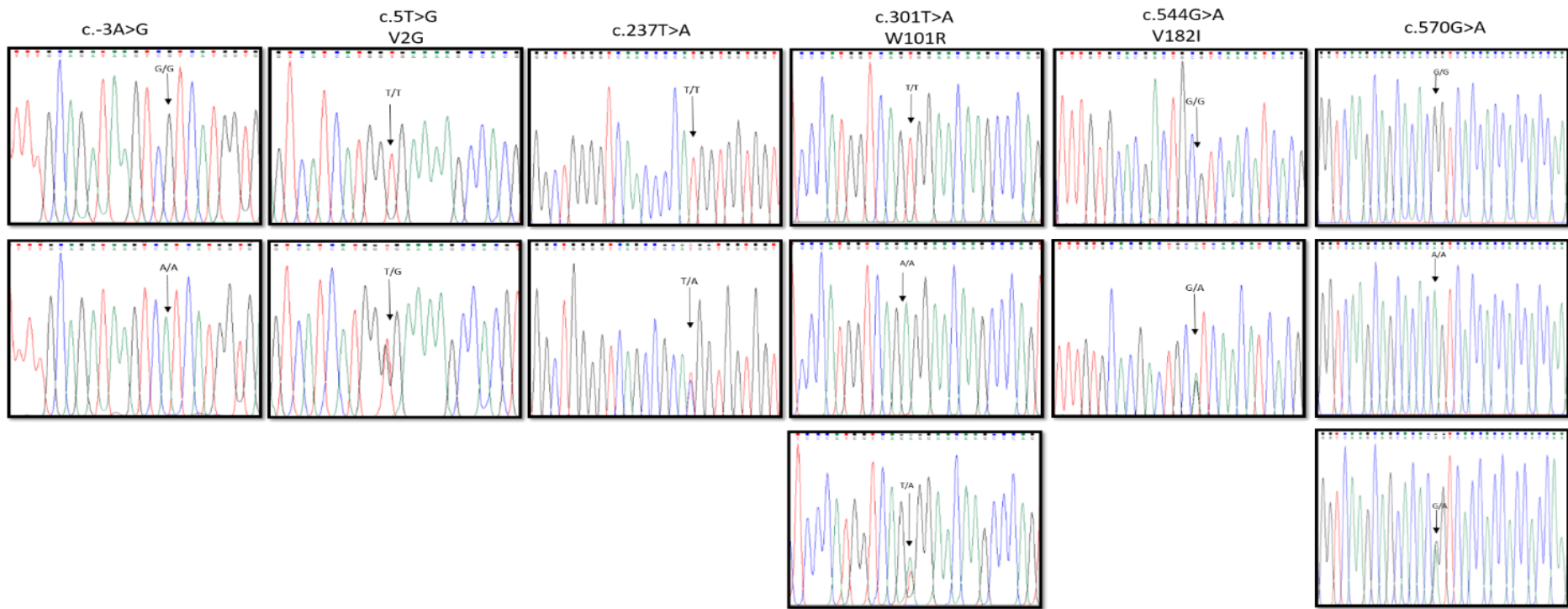


Figure 2. Electropherogram of all SNPs found including the new ones (c.5T>G, c.237T>A, c.544G>A) identified in this study. Four colours indicate individual bases of DNA sequence (blue: cytosine, red: thymine, black: guanine, green: adenine).

None of the breeds analyzed were polymorphic for all markers at the same time. Regarding the SNP -3A>G, this was monomorphic for the A allele in all breeds except for Thoroughbred, Pura Raza Española, Jaca Navarra and Italian Trotter, where the A allele was the majority allele with a frequency ≥ 0.90 (Table 1). The SNPs c.5T>G (V2G) and c.544G>A (V182I) were monomorphic for the T and G allele respectively in all breeds, with the exception of Thoroughbred (c.5T>G (V2G)) where the T allele had a frequency of 0.98 and Jaca Navarra (c.544G>A (V182I)) where the G allele has a frequency of 0.98 (Table 1).

The novel c.237T>C polymorphism was only polymorphic in Burguete and Jaca Navarra, while c.301T>A (W101R) was only polymorphic in Thoroughbred and Italian Trotter, the rest of the animals being TT homozygous for both markers. In the breeds where these SNPs were polymorphic, the T allele stands out with a frequency ≥ 0.80 (Table 1).

Table 1. Genotypic and allelic frequencies for polymorphic sites of the horse *PRNP* gene. Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

Polymorphisms/Breed	Genotype frequencies			Allele Frequencies		HWE (P value)
	AA	AG	GG	A	G	
c.-3A>G						
Thoroughbred (N=48)	0.98	0	0.02	0.98	0.02	< 0.00001
Pura raza Española (N=30)	0.97	0.03	0	0.98	0.02	0.98
Jaca Navarra (N=21)	0.95	0.05	0	0.98	0.02	0.98
Italian Trotter (N=5)	0.80	0.20	0	0.90	0.10	---
c.5T>G						
Thoroughbred (N=48)	0.96	0.04	0	0.98	0.02	0.98
c.237T>C						
Burguete (N=19)	0.80	0.20	0	0.90	0.10	0.80
Jaca Navarra (N=21)	0.90	0.10	0	0.96	0.04	0.94
c.301T>A						
Thoroughbred (N=48)	0.98	0	0.02	0.98	0.02	< 0.00001
Italian Trotter (N=5)	0.80	0	0.20	0.80	0.20	---
c.544G>A						
Jaca Navarra (N=21)	0.96	0.04	0	0.98	0.02	0.98

Estudio 2

The c.570G>A marker was monomorphic for the G allele in Thoroughbred, Westphalian and Nooitgedacht and was the allele with a frequency above 0.70 in all other breeds (Table 2). The c.525C>A (N175K) SNP was polymorphic in all breeds tested except Oldenburg, Hafliger and Paint (Table 2). In most breeds where c.525C>A (N175K) was polymorphic, the A allele was observed in higher frequency, except in Thoroughbred, Pura Raza Española and Westphalian, where the C allele was observed with a frequency of 0.68, 0.83 and 0.62 respectively (Table 2). All polymorphisms studied were found in Hardy-Weinberg equilibrium, except c.-3A>G and c.301T>A (W101R).

Table 2: Genotypic and allelic frequencies for polymorphisms c.525C>A and c.570G>A of the horse *PRNP* gene for breeds with a number of N ≥ 5. Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE)

Breed	N	c.525C>A					HWE (P value)	c.570G>A					HWE (P value)
		CC	CA	AA	C	A		GG	GA	AA	G	A	
Thoroughbred	48	0.52	0.29	0.19	0.66	0.34	0.06	1	0	0	1	0	1
Pura raza Española	30	0.67	0.33	0	0.83	0.17	0.55	0.93	0.07	0	0.97	0.03	0.96
Burguete	29	0.07	0.17	0.76	0.15	0.85	0.20	0.97	0.03	0	0.98	0.02	0.99
Jaca Navarra	21	0	0.23	0.76	0.12	0.88	0.80	0.67	0.33	0	0.83	0.17	0.61
Standardbred	18	0.06	0.44	0.50	0.28	0.72	0.90	0.72	0.22	0	0.83	0.17	0.76
Quarter Horse	11	0.09	0.54	0.36	0.36	0.64	0.84	0.91	0.09	0	0.95	0.05	0.96
Westphalian	8	0.50	0.25	0.25	0.62	0.38	---	1	0	0	1	0	---
Nooitgedacht	8	0.12	0.25	0.63	0.25	0.75	---	1	0	0	1	0	---
Arabian	7	0.14	0.42	0.43	0.36	0.64	---	0.70	0.30	0	0.86	0.14	---
Italian Trotter	5	0	0.40	0.60	0.20	0.80	---	0.40	0.60	0	0.70	0.30	---

Thirteen different haplotypes (Ht) were found in all the animals studied, the frequency of each of them is shown in Table 3. Haplotypes Ht1, Ht2 and Ht9 were the most abundant ones with a frequency of 47%, 42% and 5.5% respectively, however, Ht1 and Ht2 were the only ones found in most of the breeds (Table 3). Haplotypes Ht3-Ht8 and Ht10-Ht13 were observed with a frequency lower than 1 %. Haplotype network analysis showed that Ht2 might be the oldest haplotype (Figure 3). Linkage disequilibrium (LD) between the 7 polymorphisms found in the equine *PRNP* gene was studied using D' and r^2 coefficients. A strong linkage disequilibrium ($r^2=0.44$ and $D'=0.74$) was observed between the markers c.-3A>G and c.301T>A (W101R).

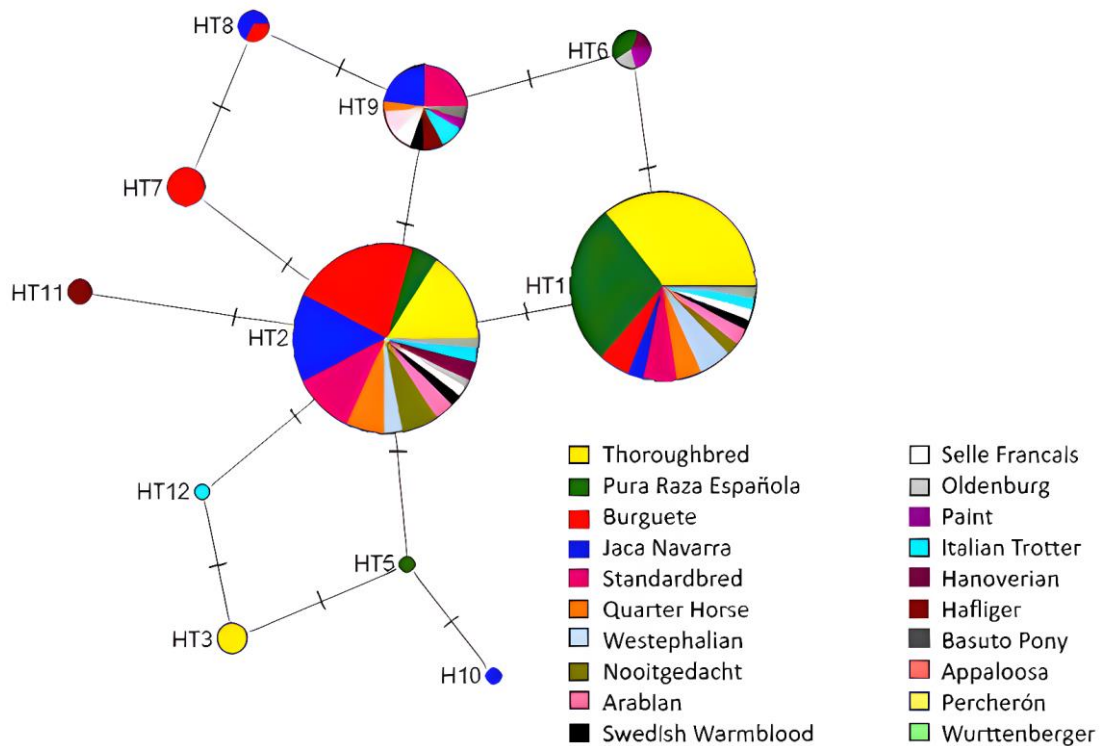


Figure 3. Haplotype network for the horse *PRNP* gene. The size of the circles is proportional to the frequency of the haplotype. The segments that cut the connectors indicate the number of mutational steps between each haplotype.

Table 3. Haplotype frequencies of 7 polymorphisms in the horse *PRNP* gene

Haplotypes	c.-3A>G	c.5T>G (V2G)	c.237T>C	c.301T>A (W101R)	c.525C>A (N175K)	c.544G>A (V182I)	c.570G>A	Frequency
Ht1	A	T	T	T	C	G	G	0.42
Ht2	A	T	T	T	A	G	G	0.47
Ht3	G	T	T	A	A	G	G	0.005
Ht4	A	G	T	T	C	G	G	0.005
Ht5	G	T	T	T	A	G	G	0.002
Ht6	A	T	T	T	C	G	A	0.012
Ht7	A	T	C	T	A	G	G	0.012
Ht8	A	T	C	T	A	G	A	0.007
Ht9	A	T	T	T	A	G	A	0.055
Ht10	G	T	T	T	A	A	G	0.002
Ht11	A	T	T	T	A	G	G	0.005
Ht12	A	T	T	A	A	G	G	0.002
Ht13	G	T	T	A	C	G	A	0.002

We estimated the potential impact that these nonsynonymous SNPs could have on the horse prion protein with PolyPhen-2, PROVEAN, PANTHER, Meta-SNP and PredictSNP. PolyPhen-2 predicted V182I (c.544G>A) and V2G (c.5T>G) as “Benign”. PROVEAN estimated both as “Neutral”. PANTHER dictates as "Possibly damaging" in the V182I (c.544G>A) polymorphism and dictates as "Possibly benign" the polymorphism V2G (c.5T>G). When considering consensus prediction with Meta-SNP and PredictSNP, both showed a neutral effect for V2G and V182I. (Table 4).

Table 4: Impact assessment of the non-synonymous V2G and V182I polymorphisms using Polyphen-2, PROVEAN, PANTHER, Meta-SNP and PredictSNP.

Polymorphism	Method	Score	Prediction
c.5T>G (V2G)	PolyPhen-2	0.033	Benign
	PROVEAN	2.034	Neutral
	PANTHER	97	Possibly benign
	Meta-SNP	0.034	Neutral
	PredictSNP	83(expected accuracy)	Neutral
c.544G>A (V182I)	PolyPhen-2	0.084	Benign
	PROVEAN	-0.174	Neutral
	PANTHER	220	Possibly damaging
	Meta-SNP	0.26	Neutral
	PredictSNP	60(expected accuracy)	Neutral

The possible effect of non-synonymous changes on the structure of the horse PrP protein is shown in Figure 4. The Swiss-PdbViewer software predicted two hydrogen bonds for codon V182, one with V184 (2.11 Å) and one with V176 (1.85 Å). When the change to I182 occurs, the hydrogen bond with V176 is lost. In contrast to this, codon

175 maintains a hydrogen bond (2.11 Å) regardless of whether the amino acid present is a lysine (K175) or an asparagine (N175).

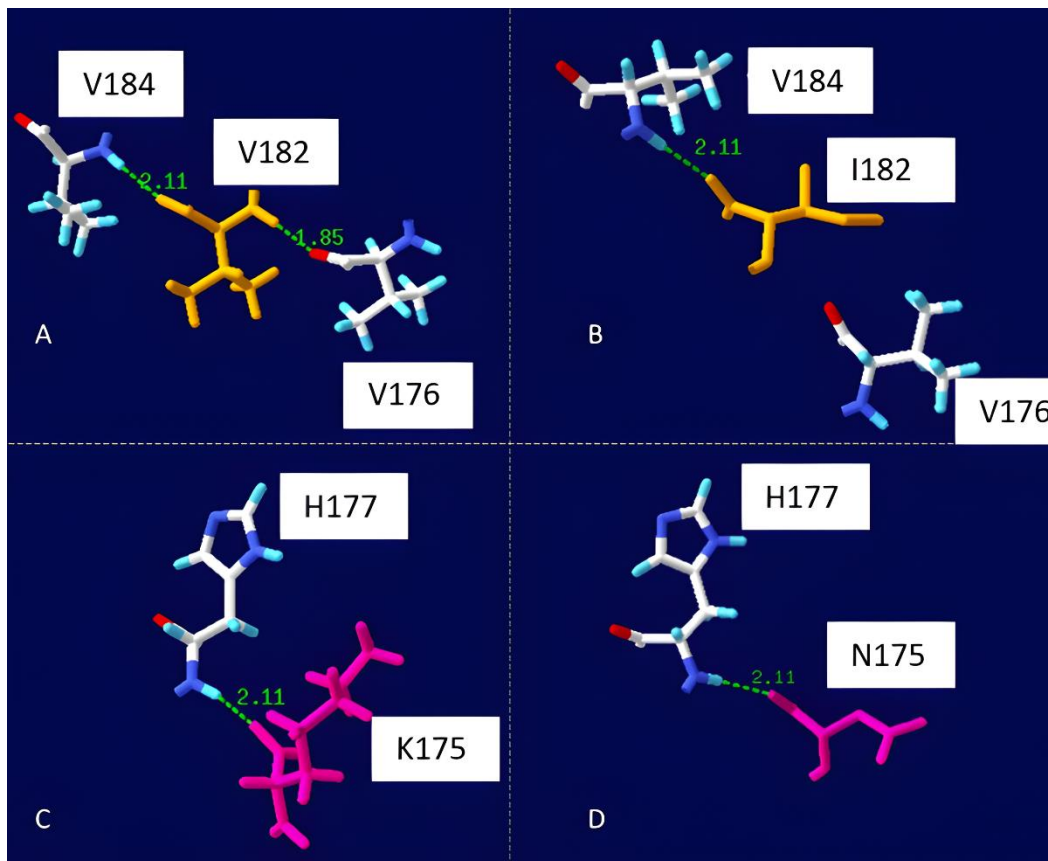


Figure 4. Hydrogen bonds of horse prion protein (PrP). The dotted line and numbers in green indicate the hydrogen bonds and the distance (Å), respectively. (A) effect of V182, (B) effect of I182 (C) effect of K175, (D) effect of N175.

When evaluating the electrostatic potential, we observed changes depending on the different substitutions of amino acids in the protein (Figure 5). In the case of valine or isoleucine at codon 182 no electrostatic changes occur, however, in the presence of N175, the positive charge between codons 172-174 disappears, and the negative charge spreads across the region adjacent to the substitution, compared to the wild-type protein (K175).

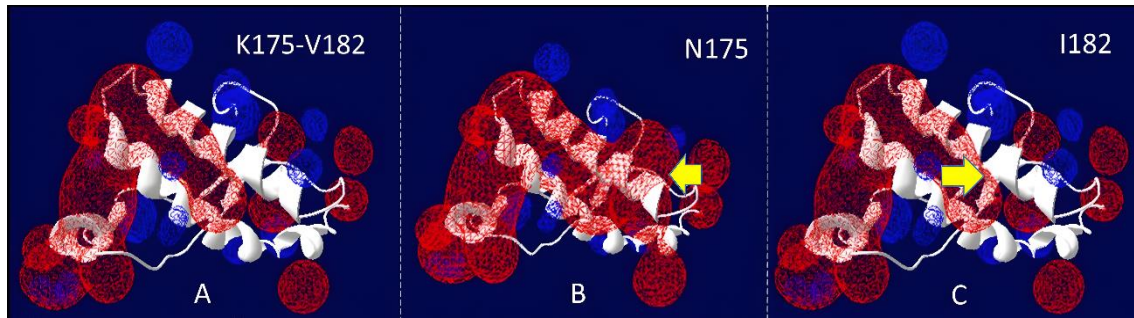


Figure 5. Effect of amino acid substitutions N175K and V182I on the electrostatic potential of horse PrP. The negative potential is shown in red and the positive potential in blue. Arrows indicate the site of substitution.

Finally, the horse prion protein sequences were classified into 16 possible haplotypes according to the alleles of nonsynonymous SNPs (V2G (c.5T>G), W101R (c.301T>A), N175K (c.525C>A) and V182I (c.544G>A)) detected in this and previous work. The AMYCO software gives values between 0 and 1, and two thresholds are typically used: 0.45 and 0.78, where a score <0.45 indicates a low propensity to aggregate and a score >0.78 refers to a high propensity to aggregate. The maximum value of amyloid propensity was 0.39 and was observed in the haplotypes 2V/101W/175N/182V (Ht1 and Ht6), 2V/101W/175N/182I, 2V/101R/175N/182V (Ht13), 2V/101R/175N/182I, 2G/101W/175N/182I, 2G/101R/175N/182V and 2G/101R/175N/182I followed with a value of 0.09 by 2V/101R/175K/182I and 2G/101R/175K/182I (Table 5). The maximum value is determined by the presence of 175N.

Table 5: Evaluation of the aggregation propensities of prion protein using AMYCO.

Haplotype	Score	Haplotype in this study
2V/101W/175N/182V	0.39	Ht1 and Ht6
2V/101W/175N/182I	0.39	-
2V/101W/175K/182V	0	Ht2, Ht5, Ht7, Ht8, Ht9 and Ht11
2V/101W/175K/182I	0	Ht10
2V/101R/175N/182V	0.39	Ht13
2V/101R/175N/182I	0.39	-
2V/101R/175K/182V	0	Ht3 and Ht12
2V/101R/175K/182I	0.09	-
2G/101W/175N/182V	0	Ht4
2G/101W/175N/182I	0.39	-
2G/101W/175K/182V	0	-
2G/101W/175K/182I	0	-
2G/101R/175N/182V	0.39	-
2G/101R/175N/182I	0.39	-
2G/101R/175K/182V	0	-
2G/101R/175K/182I	0.09	-

Discussion:

Until today, no case of prion disease in horses has been demonstrated yet, despite this, both the structural stability of the protein and the genetic polymorphisms are still being studied because of the importance of understanding the resistance of specific prion protein sites. In this study, we assessed the polymorphisms in the ORF of the *PRNP* gene

in different horse breeds. As previously detected, a total of 4 SNPs were found in the ORF of the horse *PRNP* gen (c.-3A>G, c.301T>A (W101R), c.525C>A (N175K), and c.570G>A) (Kim & Jeong, 2018; Y. C. Kim et al., 2020). In addition, we have found other three novel polymorphisms (c.5T>G (V2G), c.237T>C c.544G>A (V182I)). One of them synonymous (237T>C) and two non-synonymous (5T>G (V2G), 544G>A (V182I)). The larger number of breeds analyzed favours the identification of new variants and therefore the genetic variability observed in the present work is higher than in previous studies.

The SNPs c.-3A>G, c.5T>G (V2G), c.237T>C, c.301T>A (W101R) and 544G>A (V182I) were polymorphic in six breeds, observing that the frequency of the most frequent allele was above 0.8. The remaining breeds were monomorphic for the most frequent allele. Similar allele frequencies for the polymorphisms c.-3A>G and c.301T>A (W101R) were observed for the Jeju and Halla breeds, while Thoroughbred was monomorphic for those SNPs (Kim & Jeong, 2018; Y. C. Kim et al., 2020). SNPs c.525C>A (N175K) and c.570G>A were polymorphic in most breeds, with allele frequencies similar to those reported in Thoroughbred, Jeju, and Halla breeds (Kim & Jeong, 2018; Y. C. Kim et al., 2020).

All polymorphisms detected were found to be in Hardy-Weinberg equilibrium except c.-3A>G and c.301T>A (W101R). The lack of heterozygous animals for these polymorphisms may be due to the fact that these animals come from different populations and the less frequent allele appears only in one homozygous horse. The out-of-equilibrium polymorphisms were the two that showed the highest linkage disequilibrium ($r^2=0.44$ and $D'=0.74$), particularly in the Thoroughbred breed that has been considered to have high levels of inbreeding (McGivney et al., 2020).

Since the haplotypes were generated considering synonymous and non-synonymous polymorphisms, several haplotypes can encode the same amino acid sequence. Therefore, the 13 haplotypes found produce 6 different amino acid sequences. Using Network software, we calculated the number of mutational steps between each of the haplotypes. While the frequency of Ht2 is not significantly different from that of Ht1 ($X^2=0.44$; $P=0.50$), and while genetic recombination within the *PRNP* gene cannot be excluded, Ht2 would be the oldest, as it is the most frequently observed, it is found in the center of the network, and therefore it is the one that has the greatest relationship with the rest of the haplotypes. Ht1 was the most frequent in the Thoroughbred, Pura Raza Española and Westphalian breeds. Although in our work we found three new SNPs, Ht1 was also the most frequent in other works in the Thoroughbred (Kim & Jeong, 2018) and Jeju and Halla breeds (Y. C. Kim et al., 2020). The high frequency of Ht1 may be due to inbreeding effects or the founder effect of the breeds.

In this study we evaluated the biological impact of nonsynonymous SNPs to horse prion protein using POLYPHEN-2, PROVEAN, and PANTHER as Kim and colleagues had previously done by assessing N175K (c.525C>A) as "benign" (Y. C. Kim et al., 2020). The V2G (c.5T>G) polymorphism was categorised as "benign". This polymorphism is found in N-terminal endoplasmic reticulum (ER) signal peptide (Kim & Jeong, 2018), so it is eliminated when the mature protein is formed (Caughey et al., 1989). In the case of the V182I (c.544G>A) polymorphism PANTHER dictates as "Possibly damaging" and it is located in the α -helix at residues 175-196. The latter is probably due to the fact that the amino acid Valine at codon 182 is highly conserved among the different species, so a change to Isoleucine is detected by the programme as a "Possibly damaging" change. Similar results were obtained in a recent study in the case of W101R (c.301T>A) (Y. C.

Kim et al., 2020). For V182I all other programmes, including the PredictSNP and Meta-SNP consensus methods predict a neutral effect of that protein change.

To estimate the amyloid propensity that different combinations of nonsynonymous SNPs could cause we used the *in silico* program AMYCO. The horse prion protein has a value of 0.39 in AMYCO. In this study, it was observed that the maximum values of amyloid propensity (0.39) are marked by the amino acid N at position 175. However, this change does not produce alterations in relation to the number of hydrogen bonds in codon 175, so it would not in itself explain the instability of the protein. A different situation occurs with codon 182, where the change to isoleucine produces the loss of the hydrogen bond, consistent with a slight increase in amyloid propensity. This may be due to reduced protein stability, as salt bridges play a key role in stabilising the secondary and tertiary structural elements of the prion protein (Guest et al., 2010).

Previous studies have shown that the horse prion protein has a key region, the highly structured globular domain, composed of three α -helix zones and two small antiparallel β -sheets (Kim & Jeong, 2018). Two structures, called the β 2- α 2 loop and salt bridges, have been reported to confer remarkable stability to the prion structure of the horse allowing it to withstand adverse conditions (Perez et al., 2010; Zhang, 2011). In *Drosophila in vitro* studies, the S167 amino acid found in this region was determined to be a key residue in the stability of the horse prion protein as it appears to introduce changes in the globular domain of PrP that result in decreased β -sheet content and increased conformational stability (Sanchez-Garcia & Fernandez-Funez, 2018). These results further support that the PrP^c of the horse is resistant to the spread of prions. Some authors have described an alternative replicative phenomenon known as "non-

adaptive prion amplification" (NAPA) (Bian et al., 2017). Initially, it was observed in mice transgenic for equine PrP^C (TgEq) that were inoculated with an experimental scrapie isolate called SSBP/1. In these experiments, only a small number of animals developed prion disease, demonstrating that equine PrP^C could be misfolded. However, the surprise came when it was discovered that, in a second propagation cycle, these prions could not be transmitted to animals of the same transgenic line (TgEq), but could be transmitted with high efficiency to ovine transgenic mice (the species of origin of the isolate used). In other words, these prions could spread, but they did not adapt to the new PrP^C, but retained their ability to infect/transmit. Furthermore, the biochemical and strain properties of the prions remained intact after NAPA.

Horses are used in a multitude of tasks as labour, for competition, and for food. Most are raised on farms, but there are also wild herds, and in both cases they may come into contact with other mammals that are already known to be susceptible to prion diseases. Therefore, the interest in understanding why certain mammals are more resistant to prion diseases is even more remarkable in the case of horses. The fact that many breeds exist and are distributed throughout the world also points to the importance of multi-breed analyses such as this one. It is therefore of great importance to continue research on prion diseases in those animals that are more resistant to prion diseases, such as horses.

In conclusion, the horse *PRNP* gene presents a low level of polymorphisms in the coding regions; moreover, none of these changes implies a greater susceptibility to amyloid propensity. The amino acidic change N175K (c.525C>A) seems to be the one that produces the greatest instability at the level of the structure. This instability could be

caused by charges in electrostatic potentials. Further studies will be necessary to validate the effect of altered hydrogen bonding and electrostatic potential on prion aggregation in the equine species.

Ethics approval and consent to participate:

Ethical review and approval were waived for this study because DNA was extracted from hair samples, what not implies animal suffering or manipulation.

References

- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet, Chapter 7, Unit7* 20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J. C., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A., Alamillo, E., Miranda, A., Prieto, I., Bossers, A., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2014). Role of the goat K222-PrPC polymorphic variant in prion infection resistance. *Viol. J.*, 88(5), 2670-2676.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, 16(1), 37-48.
- Barillet, F., Mariat, D., Amigues, Y., Faugeras, R., Caillat, H., Moazami-Goudarzi, K., Rupp, R., Babilliot, J.-M., Lacroux, C., & Luga, S. (2009). Identification of seven haplotypes of the caprine PrP gene at codons 127, 142, 154, 211, 222 and 240 in French Alpine and Saanen breeds and their association with classical scrapie. *J. Gen. Virol.*, 90(3), 769-776.
- Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, 76 (Pt 3), 509-517. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-3-509>
- Bendl, J., Stourac, J., Salanda, O., Pavelka, A., Wieben, E. D., Zendulka, J., Brezovsky, J., & Damborsky, J. (2014). PredictSNP: robust and accurate consensus classifier for prediction of disease-related mutations. *PLoS Comput. Biol.*, 10(1), e1003440.
- Bian, J., Khaychuk, V., Angers, R. C., Fernández-Borges, N., Vidal, E., Meyerett-Reid, C., Kim, S., Calvi, C. L., Bartz, J. C., & Hoover, E. A. (2017). Prion replication without host adaptation during interspecies transmissions. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 114(5), 1141-1146.
- Bossers, A., Belt, P., Raymond, G. J., Caughey, B., de Vries, R., & Smits, M. A. (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 4931-4936. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4931>
- Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B., & Smits, M. A. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 77 (Pt 10), 2669-2673. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2669>
- Bouzalas, I. G., Dovas, C. I., Banos, G., Papanastasopoulou, M., Kritas, S., Oevermann, A., Papakostaki, D., Evangelia, C., Papadopoulos, O., Seuberlich, T., & Koptopoulos, G. (2010). Caprine PRNP polymorphisms at codons 171, 211, 222 and 240 in a Greek herd and their association with classical scrapie. *J Gen Virol*, 91(Pt 6), 1629-1634. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017350-0>
- Capriotti, E., Altman, R. B., & Bromberg, Y. (2013). Collective judgment predicts disease-associated single nucleotide variants. *BMC Genom*, 14, 1-9.
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., & Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, 63(1), 175-181. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.1.175-181.1989>
- Choi, Y., & Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31(16), 2745-2747. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195>
- Cinar, M., Schneider, D., Waldron, D., O'Rourke, K., & White, S. (2018). Goats singly heterozygous for PRNP S146 or K222 orally inoculated with classical scrapie at birth show no disease at ages well beyond 6 years. *Vet. J. VET J*, 233, 19-24.
- Collinge, J., Palmer, M. S., & Dryden, A. J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337(8755), 1441-1442. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93128-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93128-v)

- Curcio, L., Sebastiani, C., Di Lorenzo, P., Lasagna, E., & Biagetti, M. (2016). A review on classical and atypical scrapie in caprine: Prion protein gene polymorphisms and their role in the disease. *Animal*, *10*(10), 1585-1593.
- Goldmann, W. (2008). PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet. Res*, *39*(4), 1-14.
- Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J., & Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J. Gen. Virol*, *75*(5), 989-995.
- Goldmann, W., Ryan, K., Stewart, P., Parnham, D., Xicohtencatl, R., Fernandez, N., Saunders, G., Windl, O., Gonzalez, L., Bossers, A., & Foster, J. (2011). Caprine prion gene polymorphisms are associated with decreased incidence of classical scrapie in goat herds in the United Kingdom. *Vet Res*, *42*, 110. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-110>
- Guest, W. C., Cashman, N. R., & Plotkin, S. S. (2010). Electrostatics in the stability and misfolding of the prion protein: salt bridges, self energy, and solvation. *Int. J. Biochem. Cell Bio.*, *88*(2), 371-381.
- Haley, N., Donner, R., Henderson, D., Tennant, J., Hoover, E., Manca, M., Caughey, B., Kondru, N., Manne, S., & Kanthasamay, A. (2020). Cross-validation of the RT-QuIC assay for the antemortem detection of chronic wasting disease in elk. *Prion*, *14*(1), 47-55.
- Heaton, M. P., Leymaster, K. A., Freking, B. A., Hawk, D. A., Smith, T. P., Keele, J. W., Snelling, W. M., Fox, J. M., Chitko-McKown, C. G., & Laegreid, W. W. (2003). Prion gene sequence variation within diverse groups of U.S. sheep, beef cattle, and deer. *Mamm Genome*, *14*(11), 765-777. <https://doi.org/10.1007/s00335-003-2283-y>
- Hunter, N. (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, *5*(8), 331-334. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(97\)01081-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)01081-0)
- Hunter, N., Foster, J. D., Goldmann, W., Stear, M. J., Hope, J., & Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, *141*(5), 809-824. <https://doi.org/10.1007/BF01718157>
- Iglesias, V., Conchillo-Sole, O., Batlle, C., & Ventura, S. (2019). AMYCO: evaluation of mutational impact on prion-like proteins aggregation propensity. *BMC Bioinform*, *20*(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2601-3>
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virol J*, *8*, 559. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-559>
- Jeong, B. H., Lee, K. H., Kim, N. H., Jin, J. K., Kim, J. I., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2005). Association of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with homozygous genotypes at PRNP codons 129 and 219 in the Korean population. *Neurogenetics*, *6*(4), 229-232. <https://doi.org/10.1007/s10048-005-0016-y>
- Jewell, J. E., Conner, M. M., Wolfe, L. L., Miller, M. W., & Williams, E. S. (2005). Low frequency of PrP genotype 225SF among free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, *86*(Pt 8), 2127-2134. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81077-0>
- Jo, W.-S., Kim, Y.-C., Oem, J.-K., & Jeong, B.-H. (2022). First report of structural characteristics and polymorphisms of the prion protein gene in raccoon dogs: The possibility of prion disease-resistance. *Front. vet. sci*, *9*, 1409.
- Johnson, C., Johnson, J., Clayton, M., McKenzie, D., & Aiken, J. (2003). Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *J Wildl Dis*, *39*(3), 576-581. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.576>
- Johnson, C., Johnson, J., Vanderloo, J. P., Keane, D., Aiken, J. M., & McKenzie, D. (2006). Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol*, *87*(Pt 7), 2109-2114. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81615-0>

- Kim, D.-J., Kim, Y.-C., Kim, A.-D., & Jeong, B.-H. (2020). Novel Polymorphisms and Genetic Characteristics of the Prion Protein Gene (PRNP) in Dogs—A Resistant Animal of Prion Disease. *Int. J. Mol. Sci*, *21*(11), 4160.
- Kim, Y. C., & Jeong, B. H. (2018). The first report of polymorphisms and genetic characteristics of the prion protein gene (PRNP) in horses. *Prion*, *12*(3-4), 245-252. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1513316>
- Kim, Y. C., Won, S. Y., Do, K., & Jeong, B. H. (2020). Identification of the novel polymorphisms and potential genetic features of the prion protein gene (PRNP) in horses, a prion disease-resistant animal. *Sci Rep*, *10*(1), 8926. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65731-5>
- Kirkwood, J., Cunningham, A., Wells, G., Wilesmith, J., & Barnett, J. (1993). Spongiform encephalopathy in a herd of greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*): epidemiological observations. *Vet. Rec*, *133*(15), 360-364.
- Kirkwood, J., & Cunningham, A. A. (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet. Rec*, *135*(13), 296-303.
- Kovacs, G. G., Head, M. W., Bunn, T., Laszlo, L., Will, R. G., & Ironside, J. W. (2000). Clinicopathological phenotype of codon 129 valine homozygote sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *26*(5), 463-472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2000.00279.x>
- Lewontin, R. (1988). On measures of gametic disequilibrium. *Genetics*, *120*(3), 849-852.
- McGivney, B. A., Han, H., Corduff, L. R., Katz, L. M., Tozaki, T., MacHugh, D. E., & Hill, E. W. (2020). Genomic inbreeding trends, influential sire lines and selection in the global Thoroughbred horse population. *Sci. Rep*, *10*(1), 1-12.
- Mead, S., Lloyd, S., & Collinge, J. (2019). Genetic factors in mammalian prion diseases. *Annu Rev Genet*, *53*(1), 117-147.
- Meydan, H., Yüceer, B., Degirmenci, R., Özkan, M., & Yildiz, M. (2012). Prion protein gene polymorphism and genetic risk evaluation for scrapie in all Turkish native sheep breeds. *Virus genes*, *45*, 169-175.
- Monello, R. J., Galloway, N. L., Powers, J. G., Madsen-Bouterse, S. A., Edwards, W. H., Wood, M. E., O'Rourke, K. I., & Wild, M. A. (2017). Pathogen-mediated selection in free-ranging elk populations infected by chronic wasting disease. *Proc. Natl. Acad. Sci*, *114*(46), 12208-12212.
- Moum, T., Olsaker, I., Hopp, P., Moldal, T., Valheim, M., Moum, T., & Benestad, S. L. (2005). Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J. Gen. Virol*, *86*(1), 231-235.
- O'Rourke, K. I., Besser, T. E., Miller, M. W., Cline, T. F., Spraker, T. R., Jenny, A. L., Wild, M. A., Zebarth, G. L., & Williams, E. S. (1999). PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, *80* (Pt 10), 2765-2679. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2765>
- O'Rourke, K. I., Spraker, T. R., Hamburg, L. K., Besser, T. E., Brayton, K. A., & Knowles, D. P. (2004). Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol*, *85*(Pt 5), 1339-1346. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79785-0>
- Papasavva-Stylianou, P., Simmons, M. M., Ortiz-Pelaez, A., Windl, O., Spiropoulos, J., & Georgiadou, S. (2017). Effect of polymorphisms at codon 146 of the goat PRNP gene on susceptibility to challenge with classical scrapie by different routes. *Virol. J.*, *91*(22), e01142-01117.
- Perez, D. R., Damberger, F. F., & Wuthrich, K. (2010). Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol*, *400*(2), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.066>

- Sanchez-Garcia, J., & Fernandez-Funez, P. (2018). D159 and S167 are protective residues in the prion protein from dog and horse, two prion-resistant animals. *Neurobiol Dis*, *119*, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.011>
- Serrano, C., Hammouchi, M., Benomar, A., Lyahyai, J., Ranera, B., Acin, C., el Hamidi, M., Monzon, M., Badiola, J. J., Tligui, N., Zaragoza, P., & Martin-Burriel, I. (2009). PRNP haplotype distribution in Moroccan goats. *Anim Genet*, *40*(4), 565-568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01873.x>
- Shi, Y. Y., & He, L. (2005). SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci. *Cell Res*, *15*(2), 97-98. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290272>
- Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 199-212. <https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.199>
- Stewart, P., Campbell, L., Skogtvedt, S., Griffin, K. A., Arnemo, J. M., Tryland, M., Girling, S., Miller, M. W., Tranulis, M. A., & Goldmann, W. (2012). Genetic predictions of prion disease susceptibility in carnivore species based on variability of the prion gene coding region. *PLoS one*, *7*(12), e50623.
- Tang, H., & Thomas, P. D. (2016). PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinformatics*, *32*(14), 2230-2232. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw222>
- Vaccari, G., Panagiotidis, C. H., Acin, C., Peletto, S., Barillet, F., Acutis, P., Bossers, A., Langeveld, J., van Keulen, L., Sklaviadis, T., Badiola, J. J., Andreeoletti, O., Groschup, M. H., Agrimi, U., Foster, J., & Goldmann, W. (2009). State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res*, *40*(5), 48. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009031>
- Vidal, E., Fernández-Borges, N., Eraña, H., Parra, B., Pintado, B., Sánchez-Martín, M. A., Charco, J. M., Ordóñez, M., Pérez-Castro, M. A., & Pumarola, M. (2020). Dogs are resistant to prion infection, due to the presence of aspartic or glutamic acid at position 163 of their prion protein. *FASEB J*, *34*(3), 3969-3982.
- Watson, N., Brandel, J.-P., Green, A., Hermann, P., Ladogana, A., Lindsay, T., Mackenzie, J., Pocchiari, M., Smith, C., & Zerr, I. (2021). The importance of ongoing international surveillance for Creutzfeldt–Jakob disease. *Nat. Rev. Neurol*, *17*(6), 362-379.
- Wik, L., Mikko, S., Klingeborn, M., Steen, M., Simonsson, M., & Linne, T. (2012). Polymorphisms and variants in the prion protein sequence of European moose (*Alces alces*), reindeer (*Rangifer tarandus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and fallow deer (*Dama dama*) in Scandinavia. *Prion*, *6*(3), 256-260. <https://doi.org/10.4161/pri.19641>
- Zhang, J. (2011). The structural stability of wild-type horse prion protein. *J Biomol Struct Dyn*, *29*(2), 369-377. <https://doi.org/10.1080/07391102.2011.10507391>

Estudio 3: Heterogeneity of pathological prion protein accumulation in the brain of moose (*Alces alces*) from Norway, Sweden and Finland with chronic wasting disease

El texto que se describe a continuación corresponde con el artículo publicado en la revista científica *Veterinary research*:

Sola D., Tran L., Våge J, Madslien K., Vuong T., Korpenfelt S.K., Ågren E., Averhed G., Nöremark M., Sörén K., Isaksson M., Acín C., Badiola J.J., Gavier-Widén D., Benestad S.L. (2023)

Doi: 10.1186/s13567-023-01208-3

Abstract

Prion diseases are a group of neurodegenerative, transmissible, and fatal disorders that affect several animal species. They are characterized by conformational conversion of cellular prion protein (PrP^C) into the pathological prion protein (PrP^{Sc}). In 2016, chronic wasting disease (CWD) gained great importance at European level due to the first disease detection, in a wild reindeer (*Rangifer tarandus*) in Norway. The subsequent intensive CWD surveillance launched in cervids, resulted in the detection of CWD in moose (*Alces alces*), with 11 cases in Norway, 3 in Finland and 4 in Sweden. These cases differ considerably from North American CWD cases, as they occurred in animals older than 10 years, and the pathological prion protein (PrP^{Sc}) was detectable in the brain but not in lymphoid tissues. These facts suggest the occurrence of a new type of CWD. The results show some immunohistochemical features that are clearly different from CWD cases in North American and Norwegian reindeer. The different types of PrP^{Sc} deposits found among the moose demonstrate strong variations between the cases supporting the postulation that these cases could carry multiple strains of CWD.

Keywords: CWD; moose; prion disease; chronic wasting disease; Prions; transmissible spongiform encephalopathy; Norway; Finland; Sweden

Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases are progressive, fatal, neurodegenerative diseases caused by transformed host proteins called prions (proteinaceous infectious particles). Prions are formed by misfolding of normal host cellular prion protein (PrP^{C}) into the disease associated isoform, PrP^{res} , “res” denoting resistance to proteinase K (PK) treatment. Due to their resistance to protease-degradation, prions accumulate as fibrillar aggregates in the central nervous system causing neurodegenerative changes and ultimately leading to death. Prions are considered to be devoid of nucleic acids and are able to cause infection in susceptible hosts upon natural or experimental transmission (Prusiner, 1982).

Transmissible spongiform encephalopathies affect both animals and humans. In animals, the TSE archetypes are scrapie in sheep and goats, bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and chronic wasting disease (CWD) in cervids, and in humans, Creutzfeldt-Jacob disease (CJD), Gerstmann-Sträussler-Scheinker disease (GSS), and fatal familial insomnia (FFI).

There are different types of TSEs which differ in relation to the origin of the prions as well as natural routes of transmission. TSEs which are contagious under field conditions such as classical scrapie and CWD spread between animals, either by direct contact with infected animals or by indirect infection from prion contaminated environment; contagious rates can be high (Schneider et al., 2008). The accumulation of prions in peripheral tissues, such as the lymphoid tissues of the intestinal tract or the tonsils, is a common feature of contagious and environmentally transmissible TSEs and as far as it is associated with the shedding of prions via excretions (John et al., 2013;

Tennant et al., 2020; Wolfe et al., 2007). Sporadic TSEs might be generally considered to be of spontaneous origin. In animals, Nor98, also called atypical scrapie, was first recognised in old sheep in Norway in 1998 (Benestad et al., 2003) and was later described to occur sporadically in most European countries (European Food Safety et al., 2021; Fediaevsky et al., 2010; Fediaevsky et al., 2008), USA, Australia and New Zealand (Cook et al., 2016; Kittelberger et al., 2010). Subsequently, atypical BSE was detected in old cattle, (Ducrot et al., 2008), with two different presentations according to the electrophoretic migration of their protease resistant prion protein or PrP^{res}, the low or L-type (L-BSE) with lower position than classical BSE, and the high or H-type (H-BSE), with higher position than classical BSE. L-BSE was detected for the first time in Italy (Casalone et al., 2004) while H-BSE was first described in France (Biacabe et al., 2004). Nor98 / atypical scrapie, as well as L-type and H-type BSE are considered to arise spontaneously in old animals (Benestad et al., 2003; Costassa et al., 2016) and the release of prions into the environment does not appear to reach the necessary levels for horizontal transmission (Andreoletti et al., 2011) and thus contagiousness.

CWD was first identified as a neurodegenerative disease in a captive mule deer (*Odocoileus hemionus*) in Colorado, USA, in 1967 and was formally diagnosed as a disease with neuropathological features characteristic of prion diseases in 1978 (Williams & Young, 1980). Since then, CWD has been reported in free-ranging and captive cervids in North America, affecting also white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*), wapiti (*Cervus canadensis*), moose (*Alces alces*) and red deer (*Cervus elaphus elaphus*). Today, CWD occurs with increasing prevalence and geographical range in North America in cervid populations (Carlson et al., 2018; Center; Miller & Williams, 2003; Williams, 2005). The disease has

also been detected in South Korea (Lee et al., 2013) after the unfortunate import of infected subclinical CWD-infected cervids, and was described for the first time in Europe in a wild reindeer (*Rangifer tarandus*) in Norway in 2016 (Benestad et al., 2016). This was also the first description of CWD in reindeer and the biochemical and immunohistochemical (IHC) features were similar to those in CWD isolates from North America (Benestad et al., 2016). The detection of CWD in Norway led to the implementation of an extensive/intensified CWD surveillance programme in Norway (Våge et al., 2020) and other Northern European countries (EFSA et al., 2020; Tranulis et al., 2021). CWD surveillance of moose in Norway, Finland, and Sweden has been described (Tranulis et al., 2021). Since 2005, more than 36,200 moose have been tested in Norway, of which 11 have tested positive for CWD. In Sweden, since 2007, more than 1,700 moose have been tested for CWD and four positive cases have been detected to date (November 2022). Finland has tested more than 800 moose since 2006, detecting two positive CWD cases (Tranulis et al., 2021), and detected a third case in moose since this publication.

The main clinical signs of CWD include marked weight loss, rough and dry coat, excessive salivation, abnormal leg movements, sudden death after handling the animals, low head and ear drooping, and behavioural changes such as loss of fear of humans, but clinical signs are more often observed in affected captive animals (Benestad & Telling, 2018). Survival time after the onset of clinical signs ranges from seven to eight months in deer (Williams & Young, 1980), but can be longer in elk (Miller et al., 1998).

An initial molecular and immunohistochemical characterisation of the three first CWD cases in moose in Norway (Pirisinu et al., 2018), showed differences from CWD in North America (Williams & Young, 1993), as well as from reindeer in Norway (Pirisinu et al., 2018). To characterise the Norwegian CWD prions strain typing transmission and adaptation to bank voles (*Myodes glareolus*) were conducted and results were compared with North American CWD strains. Based on differences in the incubation times, deposition of prions in the brain, neuropathological and biochemical characteristics in the bank voles, it was concluded that Norwegian CWD prion strains were distinct from the North American strains, indicating that the latter were not likely to be the direct cause of the detected cases of CWD in Norway. Furthermore, it was shown that CWD in reindeer and moose in Norway were caused by different strains, supporting that circulation of CWD between species in Norway was unlikely, unless adaptation has taken place. Biochemical differences were also observed among the three first CWD cases in moose in Norway, which were reflected in the isolation of two different vole adapted strains. (Nonno et al., 2020). These results were corroborated in transmission studies into transgenic and gene targeted mice expressing deer or elk PrP, which confirmed differences from North American CWD and between Norwegian moose and reindeer CWD (Bian et al., 2021), and differences among the moose isolates (Bian et al., 2021; Nonno et al., 2020). Interestingly, adaptation of one Norwegian isolate during iterative passages in the mice resulted in prions with characteristic of North American strains

In the present study, cases of CWD in moose from Norway, Sweden, and Finland were characterized by IHC, applying a panel of monoclonal antibodies (mAbs). The aim of this work was to obtain a better understanding of the neuropathological presentation

and PrP^{Sc} deposition in the brain of natural occurring CWD in moose in the Nordic countries and to identify any similarities and variations between cases.

Materials and Methods

Description of the animals

The moose investigated were CWD positive cases detected by the surveillance programmes in Norway, Sweden, and Finland described above. The country of origin and their location, their age and sex are reported in Tranulis (2021), except for an additional moose from Norway. In summary, 13 animals were investigated, seven from Norway (No); one male and six females, 12 to 20 years old, four from Sweden (Sw); all females, >10 to 16 years old, and two from Finland (Fi); both females, 15 and 18 years old. The animals were designated as No1, No2, No3, No4, No5, No6, No7, Sw1, Sw2, Sw3, Sw4, Fi1 and Fi2 (table 1).

Table 1. Identification of the moose investigated. The PrP genotype of all moose were KK109 except No4 and No6 which were QQ109.

ID	Country	Age (years)	Sex	Clinical observations
No1: 16-P138	Norway	13	Female	Abnormal behaviour, killed
No2: 16-P153	Norway	14	Female	Found dead with trauma
No3:17-CD11399	Norway	13	Female	Hunted but with abnormal behaviour (post-mortem detected hip dislocation)
No4: 18-CD24724	Norway	15	Female	Abnormal behaviour, killed (post-mortem detected hip dislocation and ethmoid tumour)
No5: 19-CD14225	Norway	20	Female	Hunted, no clinical signs
No6: 19-CD24854	Norway	12	Female	Found dead
No7: 21-CD41	Norway	13	Male	Killed due to a broken leg
Sw1: 19-VLT000541	Sweden	16	Female	Emaciated, walking in circles, seemed blind
Sw2: 19-VLT000876	Sweden	16	Female	Emaciated, behavioural changes
Sw3: 19-VLT002322	Sweden	>10	Female	Hunted. Clinically healthy (but altered behaviour)
Sw4: 20-VLT002459	Sweden	14	Female	Lame, indolent
Fi1: 1256/20	Finland	15	Female	Found dead
Fi2: 2054/20	Finland	18	Female	Emaciated, in lying position

Description of the samples and tests

Primary diagnostic analyses of the spoon sample

Samples of brain stem at the level of the obex (hereafter referred to as “obex”) and of retropharyngeal lymph nodes were collected as part of the surveillance programme. The screening diagnostic tests (TeSeE ELISA; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and/or HerdCheck ELISA; (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA) for detection of protease-resistant core of PrP^{Sc} (PrP^{res}) were applied. The CWD diagnosis was confirmed by western blot testing (TeSeE WESTERN BLOT; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA,

USA). Following positive results, the whole brain, and additional lymph nodes and tonsils, if available, were collected. The brain was divided mid-sagittally. One half was fixed in 10% neutral buffered formalin, and the other half was frozen at -20 °C. The lymph nodes were equally divided, and formalin fixed or frozen.

To investigate PrP^{Sc} distribution in the brain by ELISA, samples from 16 different brain areas were obtained from the unfixed brain from CWD positive moose in Sweden and Norway (Figure 1). The ELISA OD values of individual brain areas were grouped into seven major brain areas: frontal cortex, temporal cortex, occipital cortex, thalamus, mesencephalon, obex and cerebellum. All cases detected in Norway could be assessed in all seven brain areas, while all cases detected in Sweden, except Sw4, could be assessed in all selected brain areas. In the case of the moose detected in Finland, it was not possible to assess the different selected areas by ELISA.

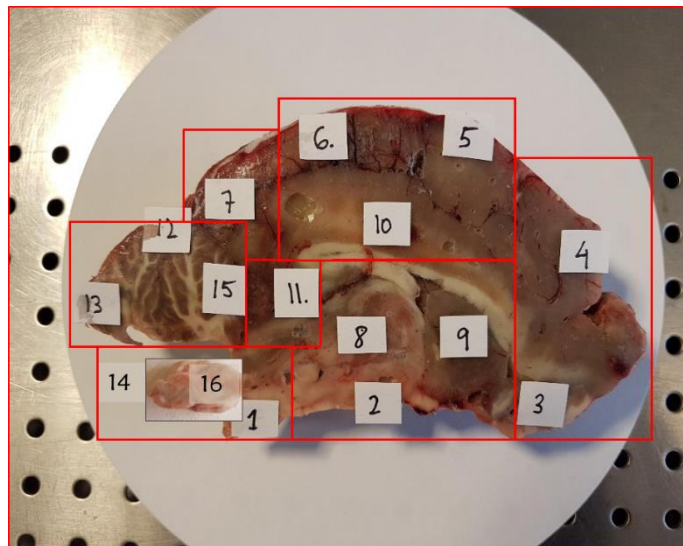


Figure 1: Example of brain areas sampling. Here, brain samples from CWD-moose Sw3 were collected to investigate the distribution and abundance of PrP^{res} in the brain by ELISA test. Sample from brainstem area number 14 was not available. Area 16 is normally collected in the primary spoon sample and is therefore added on this picture. For simplification purpose, some of the 16 areas were grouped in the results into seven established brain areas as illustrated with the red boxes. Area 3 and 4 correspond to frontal cortex, area 5, 6 and 10 to temporal and parietal cortex, area 7 to occipital cortex, area 2, 8 and 9 to thalamus, area 11 to midbrain, area 1, 14 and 16 to medulla oblongata and area 12, 13 and 15 to cerebellum.

Analyses of the additional brain samples

ELISA

Most of the moose brain areas were analysed only by the TeSeE™ SAP combi kit from Bio-Rad, ELISA test, and thereafter also by HerdChek* BSE-Scrapie ELISA test from IDEXX. The screening diagnostic tests (TeSeE™ SAP combi kit; Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) and/or HerdChek* BSE-Scrapie ELISA test (IDEXX Laboratories, Westbrook, USA) for detection of protease-resistant core of PrP^{Sc} (PrP^{res}) were applied. All the samples were analysed at the Norwegian National Veterinary Institute (NVI), one of the four WOA (founded OIE) reference laboratories for CWD.

TeSeE™ SAP Combi ELISA was performed following the manufacturer's instructions. Briefly, 250 µL of the homogenate sample was incubated for 10 min at 37 °C with 250 µL of denaturing solution, proteinase K solution (proteinase K in buffer A). The digestion was stopped by addition of 250 µL of clarifying solution, buffer B. After centrifugation at 20 000 x g for 10 min, the pellet was denatured in 25 µL buffer C for 5 min at 100 °C then diluted with 125 µL reagent R6. 100 µL was added into the ELISA plate and incubated 30 min at 37 °C. The plate was washed, incubated with respectively conjugate solution (30 min at 5°C), and substrate (30 min in darkness at room temperature). Stop solution was added to the plate and OD values were read at 450 nm and 620 nm.

For the HerdChek ELISA test, following the manufacturer's instructions, 120 µL of homogenate was mixed with 30 µL diluent solution (D1 and D2), and 100 µL of the mixture was loaded on to the antigen-capture plate for 45 min at room temperature with shaking. After washing, the plate was incubated with respectively conditioning

buffer CB (10 min), conjugate anti-PrP antibody CC (45 min), TMB (15 min in darkness). Stop solution was added to the plate and OD values were read at 450 nm and 620 nm.

Immunohistochemistry protocol

Brain, lymph nodes, and tonsil samples were formalin-fixed for >48 h and processed by standard histopathological techniques. IHC was used to visualize PrP^{Sc} distribution. Briefly, tissue sections on poly-L-lysine glass slides were deparaffinised, rehydrated, treated in 98% formic acid for 30 min, and autoclaved for antigen retrieval at 121 °C for 30 min in 0.01M citric acid pH 6.0. Endogenous peroxidase activity was inhibited with blocking reagent (EnVision™ + System HRP [(AEC)] DAKO, Glostrup, Denmark) for 10 min.

Non-specific antigenic sites were blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS). The sections were incubated overnight at 4 °C with one of the monoclonal mAbs 12B2 (1:5000), 9A2 (1:4000), L42 (1:2000), SAF 84 (1:10 000) and P4 (1:3000). Several antibodies with different epitopes (sheep prion protein [PrP] numbering) were used for IHC: SAF84 (aa 167–173) were obtained from Bertin Pharma (Montigny-le-Bretonneux, France), L42 (aa 148–153) from R-Biopharm (Darmstadt, Germany), 9A2 (aa 102–104) and 12B2 (aa 93–97) from Wageningen Bioveterinary Research (Lelystad, Netherlands) and RIDA mAB P4 (aa 84-104) from R-Biopham (Germany).

Sections were then incubated for 45 min at 37 °C with secondary antibody, and the chromogen (EnVision™ + System HRP [(AEC)] DAKO, Glostrup, Denmark) was used for

10 to 15 min to visualize the immunostaining. Finally, the sections were counterstained with haematoxylin solution and mounted.

In each run, tissues from CWD-negative and CWD-positive moose and reindeer were added as negative and positive controls.

Immunohistochemistry scoring

The deposition of prions in tissues as detected by IHC is referred to as PrP^{Sc}. Regarding the pattern of PrP^{Sc} deposition, the classification made by Jeffrey's (Gonzalez et al., 2002; Jeffrey & Gonzalez, 2007). was applied, in which they establish different types of deposition. Of these, the following types were observed in this study: fine punctate, coarse granular, intraneuronal, intraglial, linear, perineuronal and stellate. For simplification, the 16 areas were grouped into seven main brain areas as illustrated in Figure 1 in red lines. The scoring system assesses the intensity and extent of distribution of PrP^{Sc} accumulation applying the following scale: 0 no stain; 1 mild; 2 moderate; 3 striking. For each animal, the amount of each "PrP^{Sc} type" was calculated as the average of the scores given in the seven brain areas. The amount of total PrP^{Sc} was calculated as the average of the scores of the seven PrP^{Sc} types.

Histopathological assessment of vacuolar degenerative changes in haematoxylin-eosin-stained sections was attempted but could not be evaluated due to artefactual vacuolation caused by autolysis.

Results

Neuroanatomical distribution and immunolabelling profiles of PrP^{Sc} in CWD-affected moose

The immunohistochemical patterns observed in CWD-positive moose by using five different antibodies were investigated and compared with the pattern obtained from a positive wild reindeer from Norway. This positive control showed an immunohistochemical pattern similar to that described in North American CWD (Williams & Young, 1993). In the negative controls, no immunostaining was observed in both moose and reindeer (Supplementary figure 1). In none of the moose, PrP^{Sc} deposition was detected in the lymphoid tissues.

An overview of the PrP^{Sc} deposition patterns obtained with each of the five anti-PrP antibodies used is given in Figure 2. L42 and SAF84 antibodies clearly detected PrP^{Sc} in the brain of all animals. With N-terminal antibodies 12B2, 9A2, and P4, most of the moose were negative (as shown for Sw1), except Sw3 and No6.

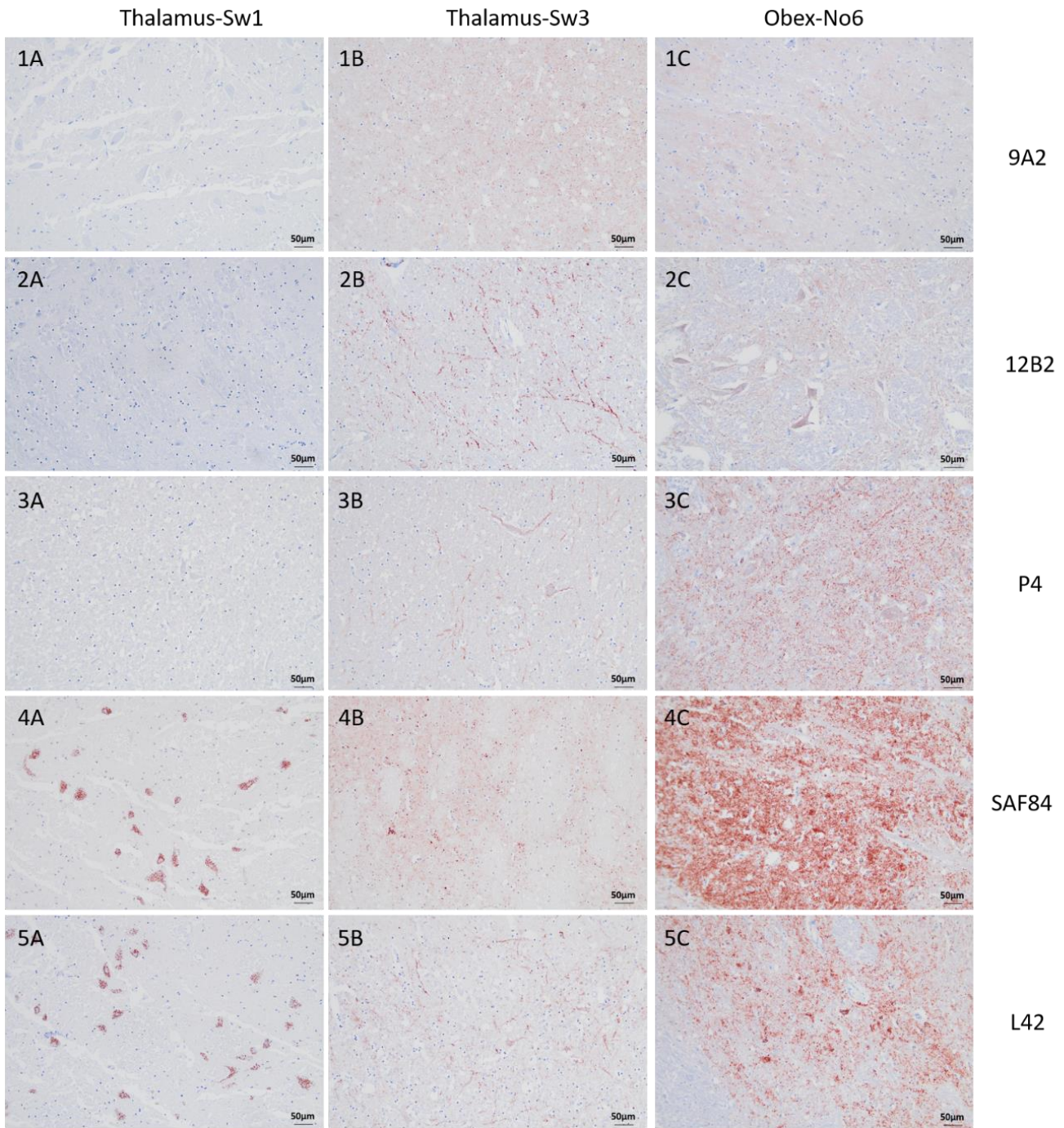


Figure 2. Differences in PrP^{Sc} immunolabelling in the thalamus and obex of CWD-affected moose with five different anti-PrP antibodies. Immunohistochemistry was performed on brain sections of CWD-positive Swedish (Sw) moose (cases number 1 and 3) and Norwegian (No) moose (case number 6). The antibodies used are indicated on the right side of the figure. mAb 9A2, 12B2 and P4 have epitopes directed against PrP N-terminus, while mAb SAF84 and L42 have central epitopes. All sections were counterstained with haematoxylin. (Bar= 50 µm).

PrP^{Sc} deposits were observed both intracellularly and extracellularly with the core antibodies L42 and SAF84 (Figures 3 and 4, respectively).

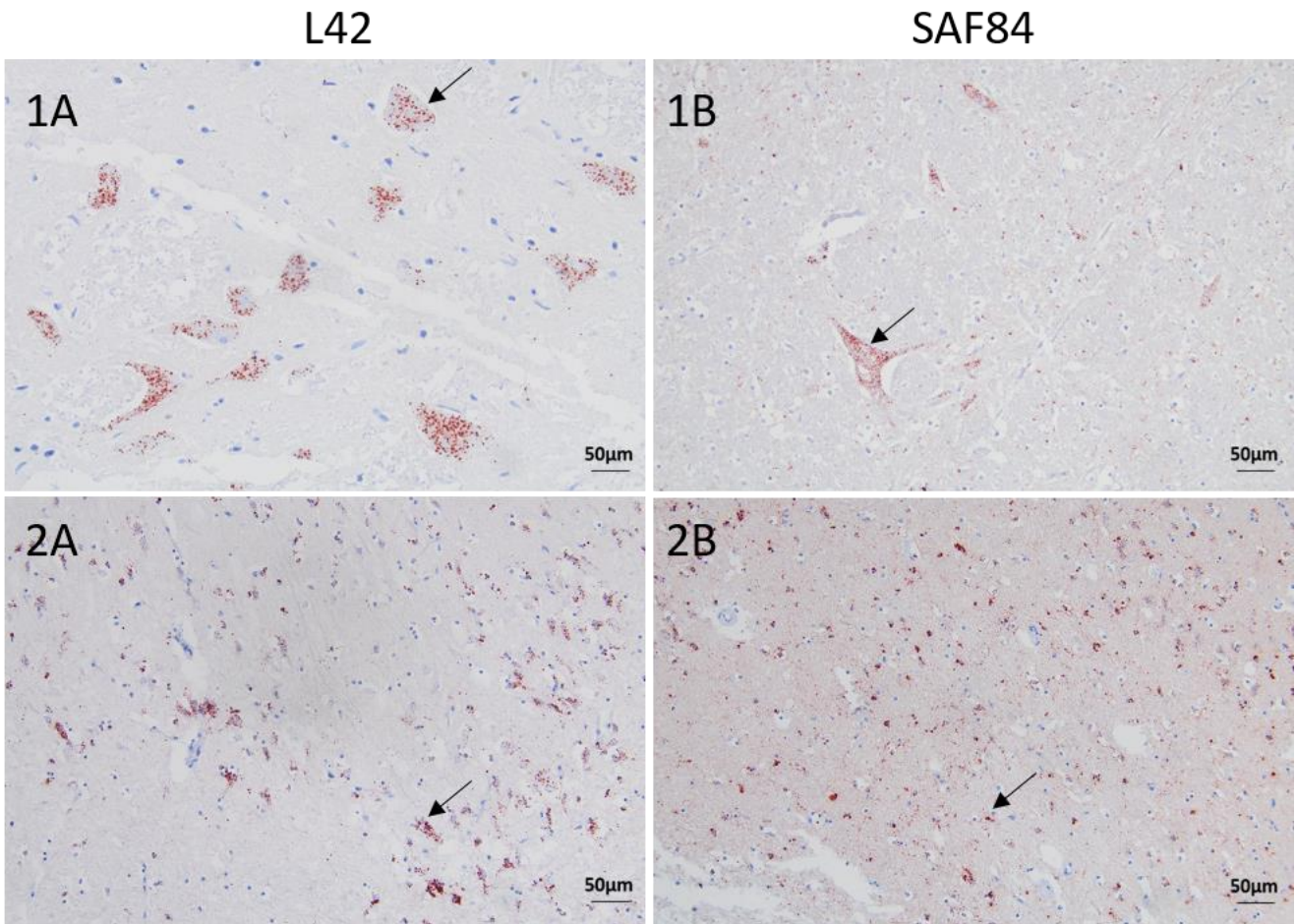


Figure 3. Intracellular PrP^{Sc} accumulation in brain sections of moose with CWD. Immunohistochemistry was performed with anti-PrP mAbs L42 and SAF84, as indicated, with moose No1. Note the intraneuronal and intraglial staining at the level of the obex (1A-1B) and frontal cortex (2A-2B), respectively, as indicated by arrows. All sections were counterstained with haematoxylin. (Bar= 50 µm).

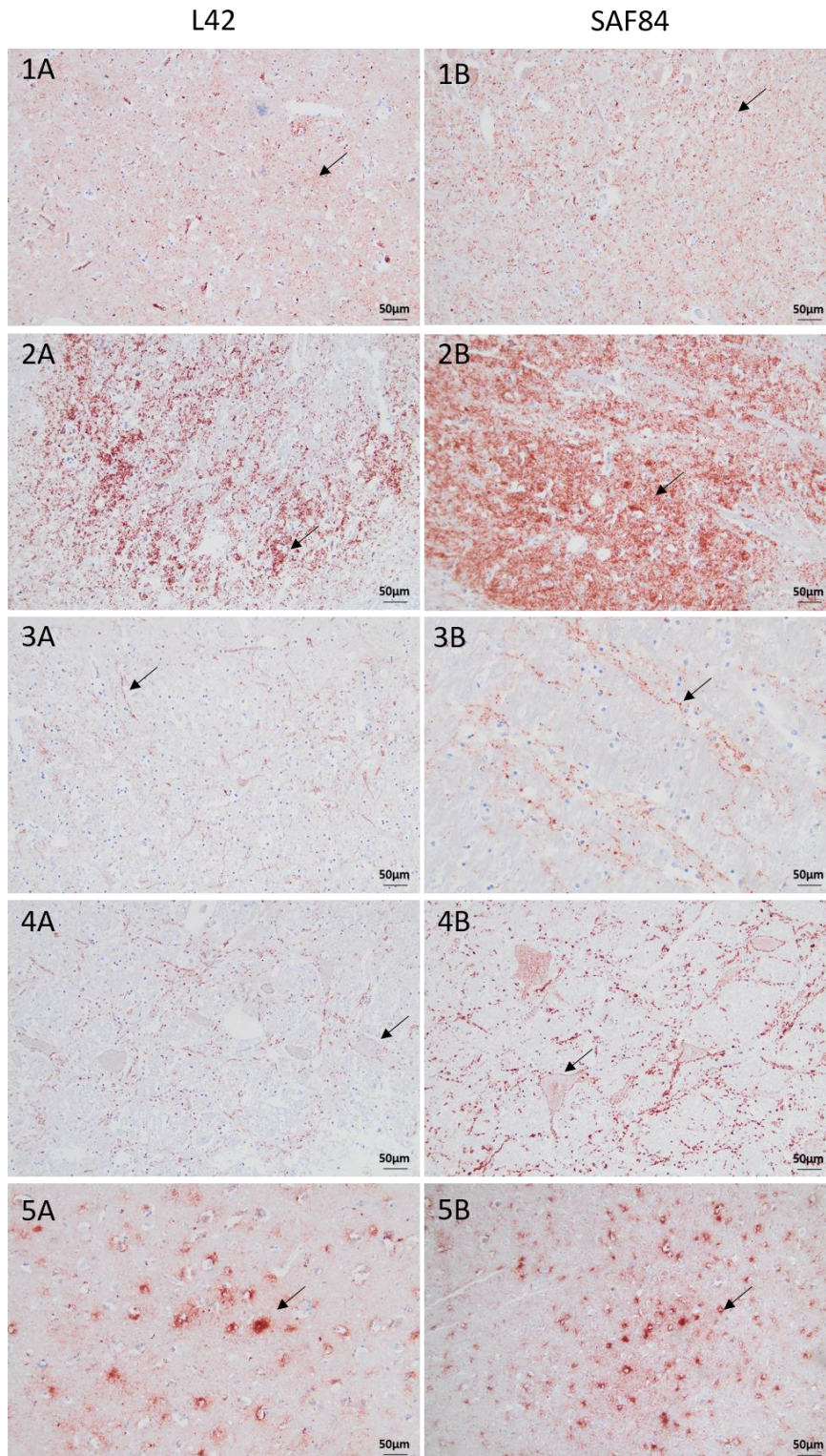


Figure 4. Extracellular PrP^{Sc} accumulation in brain sections of moose with CWD. Immunohistochemistry was performed with anti-PrP mAbs L42 and SAF84, as indicated. Note the fine punctuate staining at the level of the thalamus with moose No1 (1A) and No3 (1B), the coarse granular PrP^{Sc} staining at the level of the obex with moose No6 (2A-2B), the linear PrP^{Sc} at the level of the obex with moose No1 (3A) and No3 (3B), the perineuronal PrP^{Sc} staining at the level of the obex found only in moose Sw3 (4A-B), and the stellate PrP^{Sc} staining in the frontal cortex found only in moose No6 (5A-5B). All sections were counterstained with haematoxylin. (Bar= 50 µm).

Graphic representations of PrP^{Sc} accumulation score as a function of the brain area or the profile of deposition are shown as Figures 5 for all moose. A great heterogeneity among animals was observed. To facilitate visualisation and showing details of single cases, cases are shown and discussed by country of detection below.

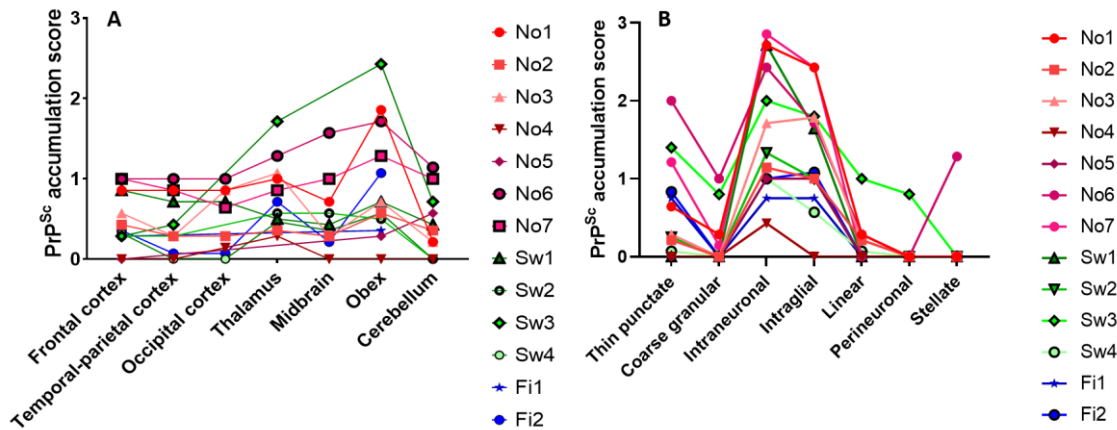


Figure 5. Neuroanatomical distribution and profiles of PrP^{Sc} in CWD-affected moose. (A) PrP^{Sc} accumulation score in different brain areas of Norwegian (No), Swedish (Sw) and Finnish (Fi) CWD-affected moose. **(B)** PrP^{Sc} profiles of the moose. SAF84 mAbs was used for quantification.

Swedish cases

All Swedish cases had high levels of intraneuronal and intraglial PrP^{Sc} deposition. Significantly lower was the PrP^{Sc} fine punctate pattern as it was only observed in Sw2 at the level of the thalamus and in Sw3 at the level of the thalamus and obex. Moose Sw3 appeared clearly different from the other cases as it showed a much more intense pattern of fine punctate and coarse granular staining in the neuropil and also additional patterns not observed in the other moose, such as the linear and the perineuronal patterns, which were detected mainly in the thalamus, obex and in the frontal brain at the level of the caudate nucleus (Figures 6 and 7).

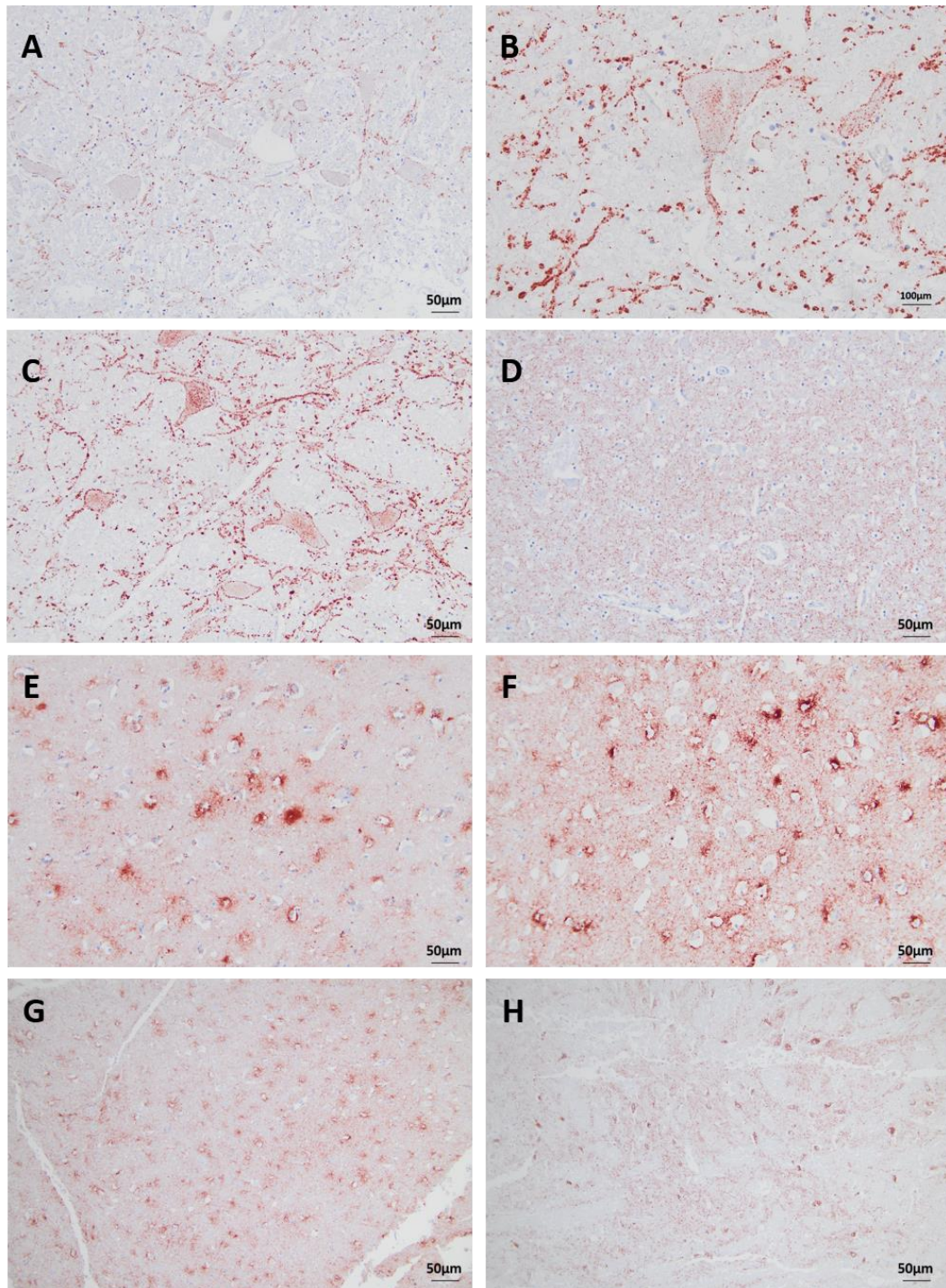


Figure 6. PrP^{Sc} immunolabelling in CWD-affected moose Sw3 and No6 with different anti-PrP antibodies. (A-C) Obex in CWD-affected moose Sw3 with SAF84 (A) (Bar= 50 µm), L42 (Bar= 100 µm) (B) and 12B2 (Bar= 50 µm) (C), showing linear and perineural or both linear and perineural PrP^{Sc} staining, respectively (Bar= 50 µm). (D) Thalamus of Sw3 with 12B2 showing fine punctate PrP^{Sc} staining (Bar= 50 µm). (E-G) Cerebral cortex of CWD-affected moose No6 with SAF84 (Bar= 50 µm) (E), L42 (Bar= 50 µm) (F) and 12B2 (Bar= 50 µm) (G) showing stellate PrP^{Sc} staining (Bar= 50 µm) (H) Midbrain of CWD-affected moose No6 with L42 showing fine punctate PrP^{Sc} staining (Bar= 50 µm). All sections were counterstained with haematoxylin.

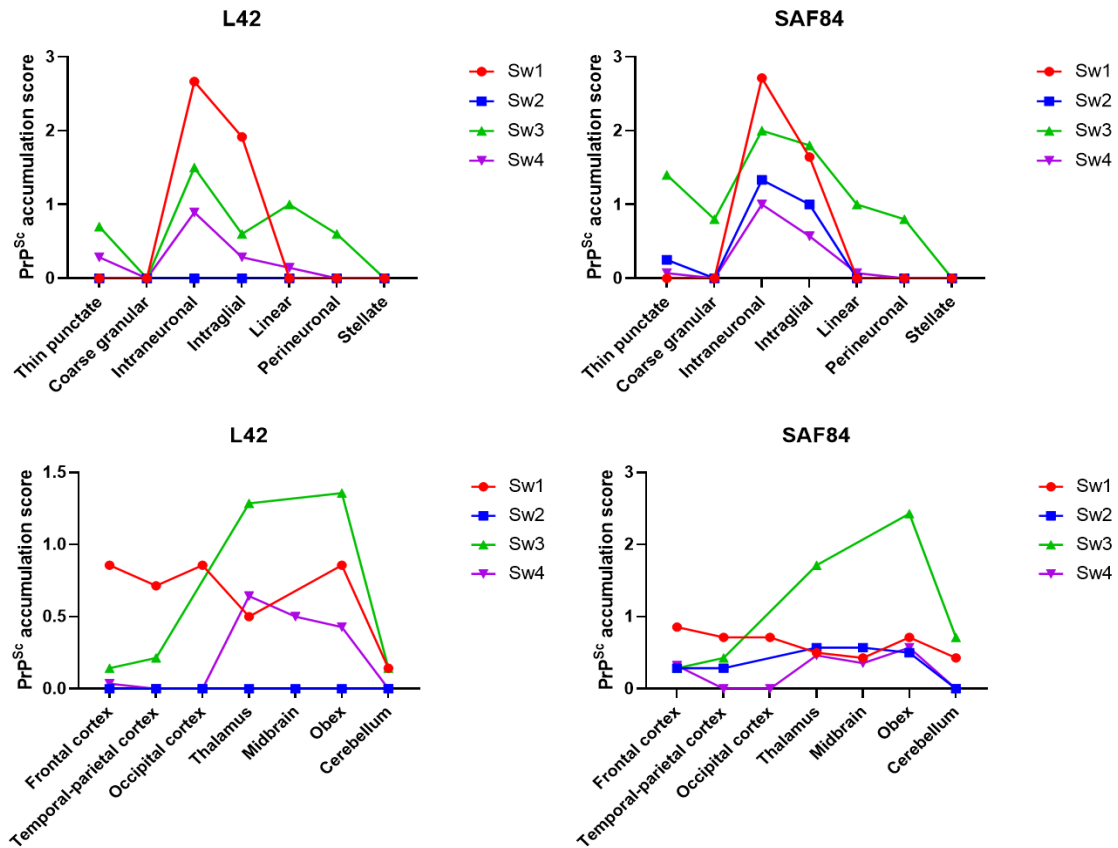


Figure 7. Neuroanatomical distribution and profiles of PrP^{Sc} in Swedish CWD-affected moose with L42 and SAF84 mAbs.

PrP^{Sc} deposition in the different brain areas varied among cases and also with different antibodies. For example, in Sw1, the frontal, temporal, parietal and occipital cortex were the main sites of deposition, with low levels in the cerebellum, with L42 mAbs. Sw3 showed the highest scores in the obex with both L42 and SAF84 mAbs and in Sw2 PrP^{Sc} was not detected with L42 mAbs (Figure 7).

Norwegian cases

The Norwegian moose showed a similar immunohistochemical PrP^{Sc} deposition profile, mostly dominated by the intra-neuronal and intra-glial patterns, followed by the

fine punctate pattern (Figure 8). However, one moose (No6) also showed a stellate deposition pattern, present throughout the cerebral cortex, which was not observed in the other moose (Figure 6).

PrP^{Sc} anatomical distribution showed intensity variations among Norwegian moose, but most brains showed PrP^{Sc} deposits in frontal cortex, parietal cortex, occipital cortex, thalamus, midbrain, medulla, and cerebellum. No4 only showed faint deposition at thalamic and occipital cortex level (Figure 8).

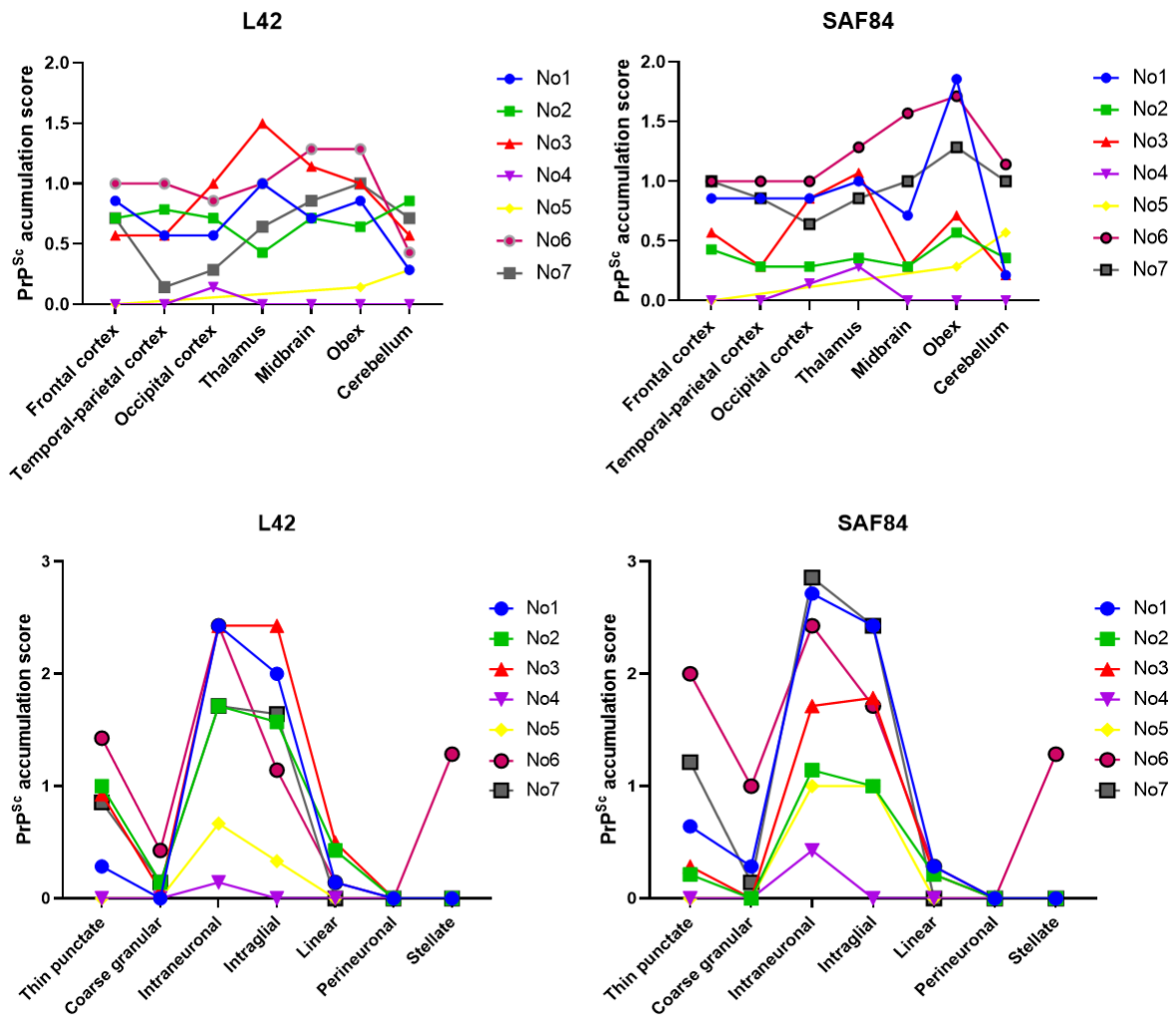


Figure 8. Neuroanatomical distribution and profiles of PrP^{Sc} in Norwegian CWD-affected moose with L42 and SAF84 mAbs.

Since one Swedish moose (Sw3) and one Norwegian moose (No6) showed some differences in the PrP^{Sc} patterns as compared with the other Swedish and Norwegian moose, their PrP^{Sc} patterns and brain distribution, with two antibodies, L42 and SAF84, were graphically compared to visualise any possible similarities between these two animals (Figure 9). The diagrams illustrated some similarities in both PrP^{Sc} patterns and distribution but also clear differences.

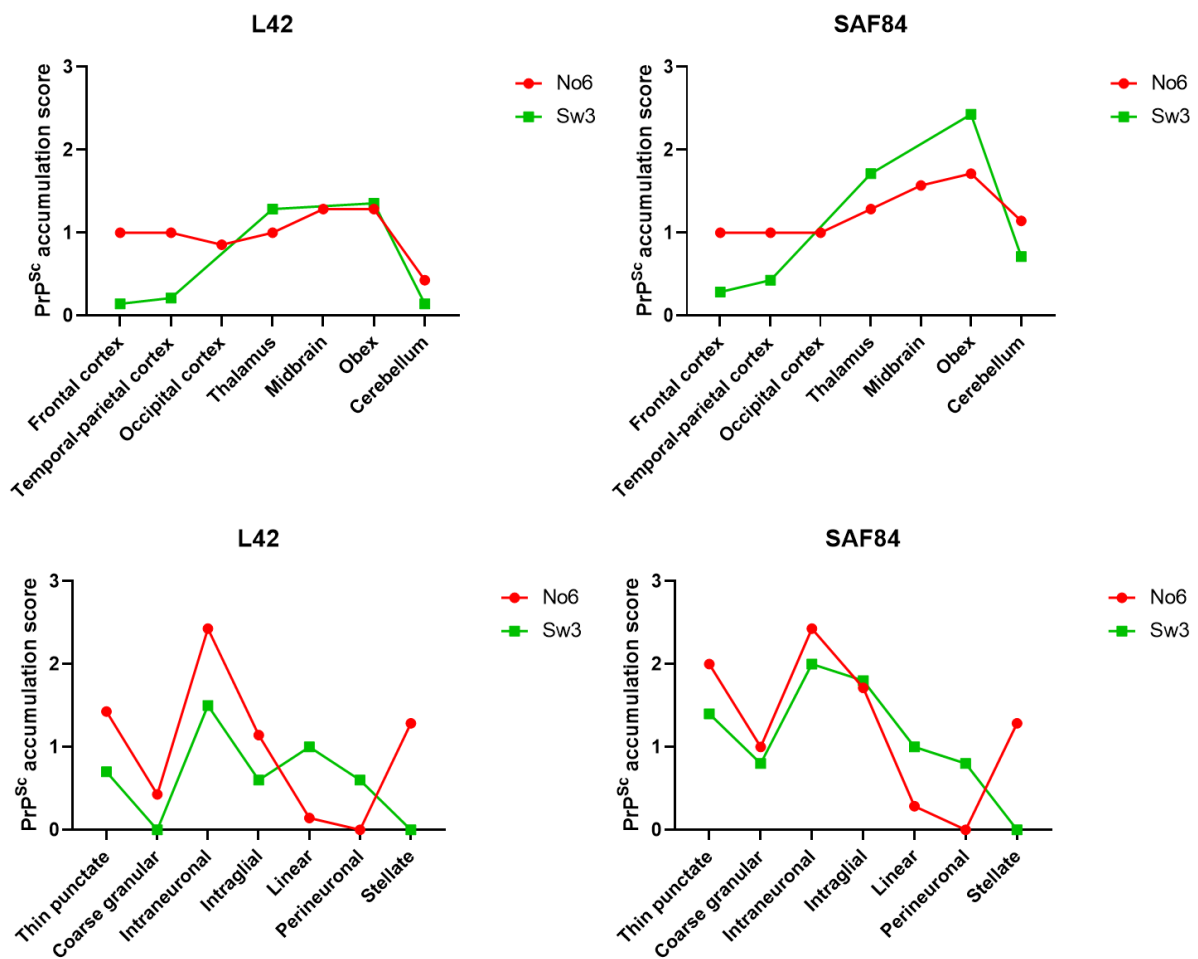


Figure 9. Comparison of the neuroanatomical distribution and profiles of PrP^{Sc} in Norwegian CWD-affected moose (No6) versus Swedish CWD-affected moose (Sw3) with L42 and SAF84 mAbs.

Finnish cases

The two cases detected in Finland showed similar deposition patterns. Fine punctate, intraneuronal, and intraglial PrP^{Sc} predominated. Fi2 showed PrP^{Sc} in all brain areas except for the cerebellum, whereas in Fi1 only frontal cortex and medulla were available, both showing PrP^{Sc} (Figure 10).

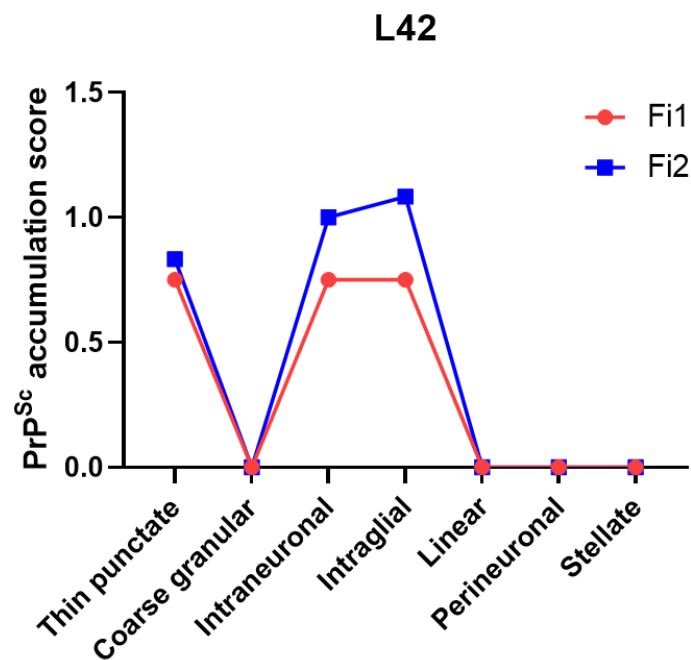


Figure 10. PrP^{Sc} profiles in the brain of Finnish moose with CWD. The PrP^{Sc} profiles were obtained with L42 antibody.

Total PrP^{Sc} comparison

The magnitude of total PrP^{Sc} (all patterns combined) immunolabelling in the different moose is shown in Figure 11. Large variations in total PrP^{Sc} accumulation were observed amongst moose. No1, No6, No7, and Sw3 animals stand out with the highest PrP^{Sc} accumulation (Figure 11).

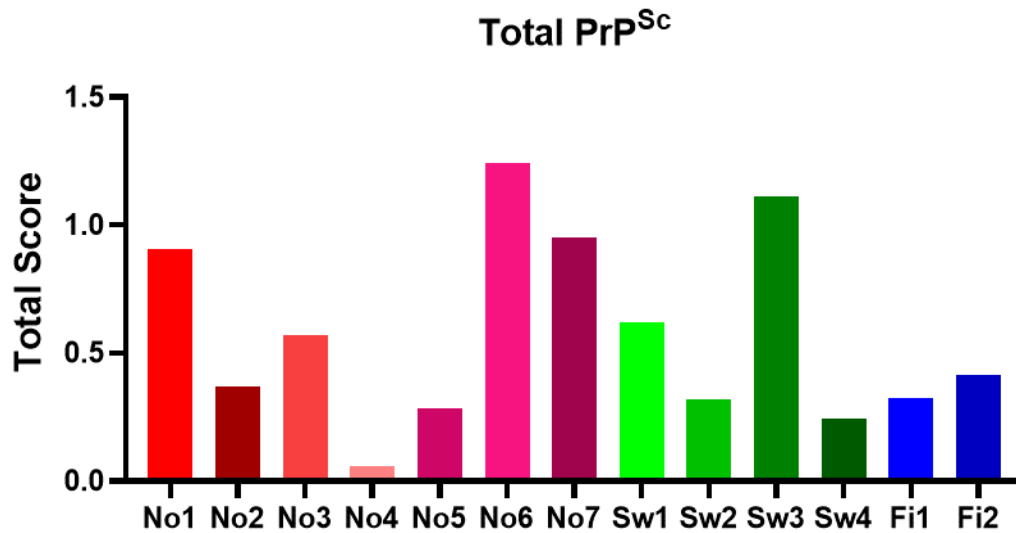


Figure 11. Total PrP^{Sc} content in the brains of in Swedish (Sw), Norwegian (No), and Finnish (Fi) moose with CWD. The scale bar signifies the total PrP^{Sc} score found in the animals from 0 to 3. It represents the mean intensity of all deposit types found in all animals.

Neuroanatomical distribution of PrP^{Sc} in CWD moose brains by ELISA

The immunohistochemical results showed above were consistent with the results of the rapid ELISA tests, which showed positivity in each of the brain areas and each moose, but strong variations between individuals. High OD-values were found in the frontal cortex, thalamus, midbrain, and obex, followed by the rest of the brain areas. The less-affected areas were the cerebellum and the occipital cortex (Table 2). For the Finnish moose the ELISA results were not available for the different brain areas.

Table 2. OD values in the IDEXX ELISA test applied to different brain areas. * Data obtained by Bio-Rad test are indicated in the table, as no material was available for testing with the IDEXX test, which normally gives higher OD values in the moose. The intensity of blue colours (from lighter to darker) represents a higher score detected in the ELISA test.

Brain area	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	Sw1	Sw2	Sw3	Sw4	Fi1	Fi2
Frontal cortex	No data	3.108	1.908*	0.023	3.244	3.5	3.5	3.5	2.714	2.209	No data	No data	No data
Temporal and parietal cortex	No data	3.284	0.427*	0.121	0.151	3.124	3.5	3.5	3.246	2.332	No data	No data	No data
Occipital cortex	No data	2.849	0.133*	0.029	0.044	3.416	1.149	3.5	2.15	1.228	No data	No data	No data
Thalamus	No data	3.2	1.751*	0.095	0.093	3.5	3.5	3.5	3.431	3.161	No data	No data	No data
Midbrain	0.081*	3.252	1.238*	0.061	0.085	2.875	3.5	3.5	3.033	3.421	No data	No data	No data
Obex	0.089*	3.23	0.160*	0.255	3.258	3.5	3.9	3.5	2.545	3.5	0.403	3.999	1.458
Cerebellum	2.220*	2.931	0.293*	0.029	0.879	3.08	1	3.343	0.798	2.028	No data	No data	No data

Discussion

The emergence of new prion strains is phenotypically visible when a propagated prion does not maintain the same biochemical and pathogenic characteristics as the original strain. This phenomenon can occur both during interspecies and intraspecies transmission (Falsig et al., 2008). In addition to these, different strains can arise spontaneously or through spontaneous mutation in the prion protein gene, *PRNP*, encoding PrP^C, making it more susceptible to misfolding (Dagvadorj et al., 2002; Takada et al., 2018). With the discovery of the prion protein and its association with the disease, diagnostic techniques for the characterisation of prion strains such as immunohistochemistry were developed (Gonzalez et al., 2002; Gonzalez et al., 2003).

It is very important to understand how the different strains of CWD detected in Europe behave biologically in European moose and to understand the epidemiology of the disease in this species to be able to inform surveillance and management strategies in different cervid species in relation to different strains. This study applied

immunohistochemical phenotyping to cases of moose CWD identified in the Nordic countries, to better characterise these cases neuropathologically and understand the biology of the prions involved.

In this immunohistochemical study, similarities but also differences in the phenotypical presentations were found amongst moose, suggesting a possible involvement of different strains of CWD. Importantly, these differences were present regardless of the country of origin. Previous studies suggest the presence of different strains of CWD in North America (Angers et al., 2010). The conformational selection model (Collinge & Clarke, 2007) interprets strains as mixtures or “clouds” of different PrP^{Sc} conformations, among which there is a predominant one that determines the phenotypic characteristics of the disease. However, in this “cloud”, minority PrP^{Sc} isoforms, sometimes called “sub-strains” or “quasi-species”, may be present, which are transmitted and replicate together with the dominant conformer below the detection threshold of current diagnostic techniques. The immunohistochemical findings indicate phenotypic heterogeneity among the cases but cannot provide information about possible presence of sub-strains or mixture of strains. To investigate the type of prion strain(s) in Norwegian CWD cases, the biochemical characteristics of disease-associated PrP and transmission to rodent models were conducted and provided preliminary evidence of several prion “strains” (Bian et al., 2021; Nonno et al., 2020). Based on preliminary observations of CWD in moose in Norway, which described the intraneuronal and intragial PrP^{Sc} deposits (Pirisinu et al., 2018), together with their old age, and especially the absence of detectable PrP^{Sc} in lymphoid tissues using traditional diagnostic methods (ELISA HerdChek from IDEXX and TeSeE from Bio-Rad), WB (TeSeE

WESTERN BLOT from Bio-Rad) and immunohistochemistry, it was postulated that these features were associated to a sporadic form of CWD (Pirisinu et al., 2018). The more extensive investigation in this study confirmed the initial findings and also revealed additional pattern presentations, namely, fine punctate deposition throughout the neuropil in several moose, marked stellate deposition in No6, and marked linear as well as perineuronal pattern in Sw3. The stellate and perineuronal patterns were only observed in a single animal.

IHC was performed with a panel of five anti-PrP mAbs generated against different parts of PrP. In early studies of CWD in Norwegian moose, a lack of staining with mAbs that bind to the N-terminal tail of PrP such as the 12B2 and 9A2 antibodies was observed (Pirisinu et al., 2018). This indicates that in these cases, this part of the protein had been degraded by endogenous proteases. These findings were corroborated for all moose in this study, except of Sw3 and No6. In these two animals, PrP^{Sc} was detected at the thalamic level with antibodies 12B2, 9A2, and P4, suggesting variability in the N-terminal proteinase K-cleavage sites.

All the moose analysed were at least 10 years old or older, which implies that affected animals were all in old age. There are rare reports of male moose reaching 21 years of age and female moose reaching 25 years of age (*The condition of the teeth determines the age of the elk.*), but most moose are harvested at earlier age. Management and hunting cause different age distribution between males and females moose populations. While female moose can reach old age, bulls rarely turn over 10 years old. The difference in age distribution is a likely explanation to why cases have been predominantly observed in female moose. In addition, no positivity for prions was

detected in any of the lymphoid tissues tested. These characteristics can comply with a prion disease of sporadic appearance (Pirisinu et al., 2018).

Not all moose were described to have shown clinical signs of disease, and information about clinical appearance prior to death was also missing for some of the cases. However, to assess any possible relationship between pathology, such as degenerative vacuolar change, and expression of clinical signs, fresh non- autolytic material is needed for histopathology. This was not available for these field cases. Moose Sw3 was shot during ordinary hunting and did not show severe clinical signs of CWD, except for the observation that it did not flee when hunters approached her. This animal had the highest amount of PrP^{Sc} as shown by immunohistochemical staining. Conversely, moose Sw2 showed one of the lowest scores for PrP^{Sc} immunohistochemical staining, but instead had showed marked behavioural changes and was emaciated. Therefore, no clear correlation between severity of clinical signs and levels of PrP^{Sc} deposits was found in this study. Moreover, subclinical cases of prion infection are observed in both animals and humans (Hill & Collinge, 2003), which is in agreement with the finding of CWD in moose No5, shot during hunting and with only discrete observed signs of disease. Additionally, the degree of disease progression in each of the animals was unknown and it was likely different for the different moose. More advanced cases in TSEs show higher levels of PrP^{Sc} accumulation, but may still be at preclinical stages. Taking into account these sources of variation direct comparison between clinical disease or stage of disease progression and PrP^{Sc} accumulation cannot be made.

Susceptibility and disease development in prion diseases are influenced in varying degrees by the genotype of the host, depending on polymorphism in the *PRNP*,

the gene encoding the cellular prion protein (Mead et al., 2019; Moazami-Goudarzi et al., 2021). In Nordic cervids, reindeer (*Rangifer tarandus*) is the species reported with highest *PRNP* variation followed by red deer (*Cervus elaphus*) and moose (*Alces alces*), while roe deer (*Capreolus capreolus*) has been reported as monomorphic (Güere et al., 2022; Wik et al., 2012). Similar findings for different deer species have been reported from Britain (Robinson et al., 2019). In Nordic moose, no association between genotypes and occurrence of CWD has been established and only codon 109 shows variation. Polymorphism at the codon 209 has not been observed in European moose (Wik et al., 2012). Most moose were homozygous KK at residue 109 while QQ109 has been reported in three moose (Güere et al., 2022; Pirisinu et al., 2018). Conversely, some genotypes have been found in a larger proportion of the reindeer among the animals infected with CWD (Guere et al., 2020). An association between genotype and immunohistochemical profile in the brain has been described in sheep with experimental classical scrapie, seemingly related to the incubation period. Other factors also influence the immunohistochemical profiles, for example the prion strain involved (Gonzalez et al., 2002). In this study a clear association between the genotype of the moose and the PrP^{Sc} characteristics could not be established. For example, moose Sw3 had distinct PrP^{Sc} features but had the same genotype as most of the other moose. The two moose with the QQ109 genotype showed some PrP^{Sc} differences as compared with the others, No4 had very low PrP^{Sc} levels and No6 showed high levels of PrP^{Sc} and also a stellate pattern not observed in any of the other moose. There are likely several factors that influence the immunohistochemical profiles besides genotypes, the incubation time in the moose in this study is unknown since they moose were naturally infected.

The findings previously reported in early studies of CWD in moose, such as characteristic intraneuronal PrP^{Sc} deposition and N-terminal truncation (Pirisinu et al., 2018) were expanded and complemented by this investigation involving more animals. This study identified both common features and also heterogeneity in the PrP^{Sc} distribution in the brain, indicating variation in the presentation of CWD in Nordic moose. The study also corroborated the lack of detection of PrP^{Sc} in lymphoid tissues in all the animals, which is in agreement with the presentation of atypical forms of TSE in bovines and small ruminants. Several transmission studies in murine models are underway, to investigate the types of prion strains in moose with CWD in the Nordic countries. The results of this study help understanding the disease in moose, and might be useful for future diagnosis and identification of various presentations of CWD cases in moose.

Ethics approval and consent to participate

The samples were obtained within wildlife surveillance programmes. All authors consent to participate.

References

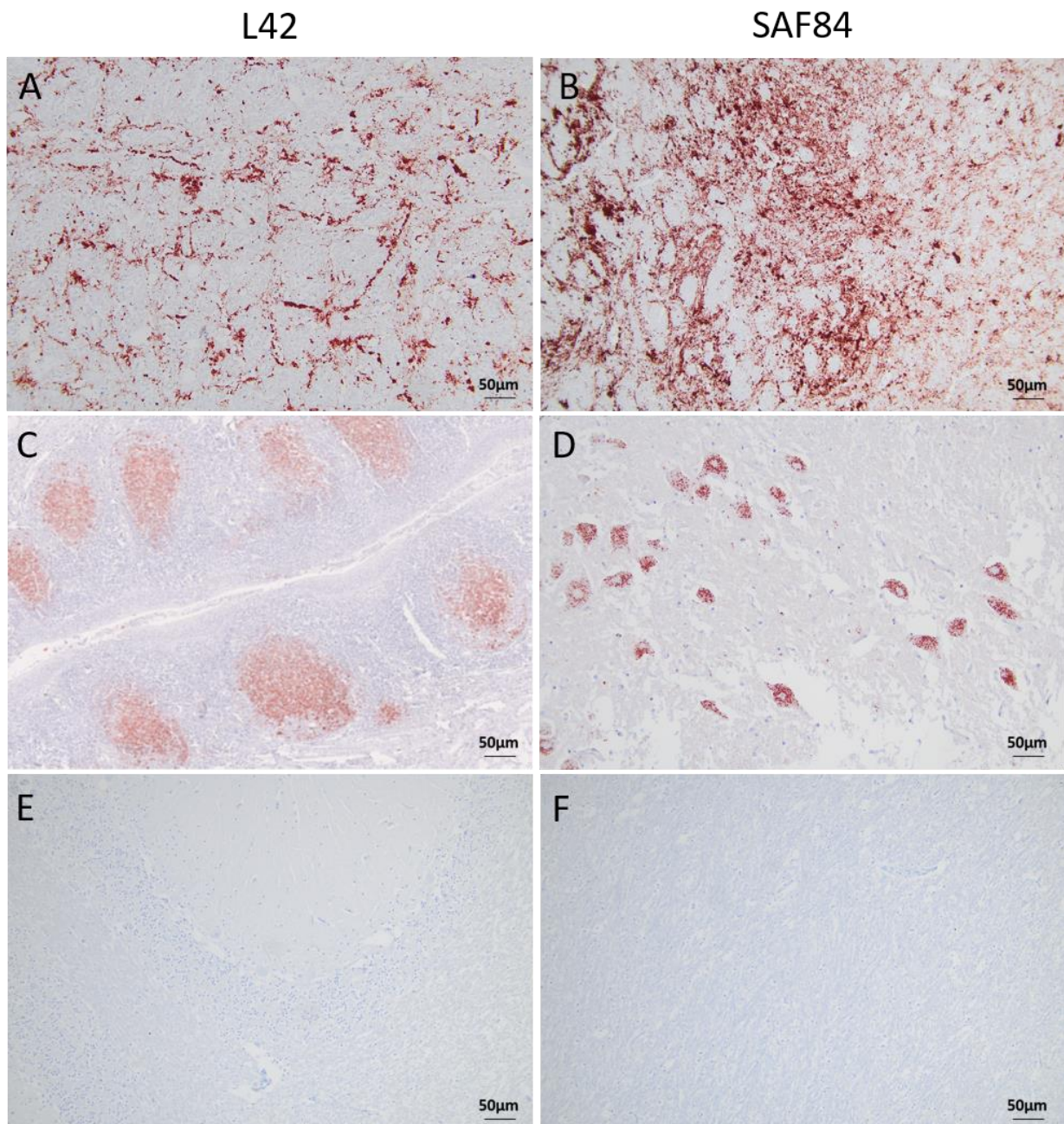
- Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaïse, C., Simon, S., Le Dur, A., Laude, H., Simmons, H., Lugañ, S., Corbiere, F., Costes, P., Morel, N., Schelcher, F., & Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, *7*(2), e1001285. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001285>
- Angers, R. C., Kang, H.-E., Napier, D., Browning, S., Seward, T., Mathiason, C., Balachandran, A., McKenzie, D., Castilla, J., & Soto, C. (2010). Prion strain mutation determined by prion protein conformational compatibility and primary structure. *Science*, *328*(5982), 1154-1158.
- Benestad, Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, J., Tranulis, M., & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet. Rec*, *153*(7), 202-208.
- Benestad, S., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., & Vikoren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, *47*(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0375-4>
- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., & Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*, *5*(1), 110-115. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400054>
- Bian, J., Kim, S., Kane, S. J., Crowell, J., Sun, J. L., Christiansen, J., Saijo, E., Moreno, J. A., DiLisio, J., Burnett, E., Pritzkow, S., Gorski, D., Soto, C., Kreeger, T. J., Balachandran, A., Mitchell, G., Miller, M. W., Nonno, R., Vikoren, T., Vage, J., Madslieñ, K., Tran, L., Vuong, T. T., Benestad, S. L., & Telling, G. C. (2021). Adaptive selection of a prion strain conformer corresponding to established North American CWD during propagation of novel emergent Norwegian strains in mice expressing elk or deer prion protein. *PLoS Pathog*, *17*(7), e1009748. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009748>
- Carlson, C. M., Hopkins, M. C., Nguyen, N. T., Richards, B. J., Walsh, D. P., & Walter, W. D. (2018). *Chronic wasting disease: status, science, and management support by the US Geological Survey*. US Department of the Interior, US Geological Survey.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., & Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 3065-3070. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305777101>
- Center, N. W. H. Retrieved 6 MARCH from <https://www.usgs.gov/media/images/distribution-chronic-wasting-disease-north-america-0>
- Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. <https://doi.org/10.1126/science.1138718>
- The condition of the teeth determines the age of the elk*. Retrieved 22 APRIL from <https://internat.slu.se/nyheter-originalen/2020/4/tandstatus-alg/>
- Cook, R., Bingham, J., Besier, A., Bayley, C., Hawes, M., Shearer, P., Yamada, M., Bergfeld, J., Williams, D., & Middleton, D. (2016). Atypical scrapie in Australia. *Aust. Vet. J*, *94*(12), 452-455.

- Costassa, E. V., Iulini, B., Mazza, M., Acutis, P., Maurella, C., Meloni, D., Pautasso, A., Capucci, L., Bozzetta, E., & Simmons, M. M. (2016). Pathogenesis and transmission of classical and atypical BSE in cattle. *J. Food Saf*, 2016018.
- Dagvadorj, A., Petersen, R. B., Lee, H. S., Cervenakova, L., Shatunov, A., Budka, H., Brown, P., Gambetti, P., & Goldfarb, L. G. (2002). Spontaneous mutations in the prion protein gene causing transmissible spongiform encephalopathy. *Ann. Neurol*, 52(3), 355-359.
- Ducrot, C., Arnold, M., de Koeijer, A., Heim, D., & Calavas, D. (2008). Review on the epidemiology and dynamics of BSE epidemics. *Vet Res*, 39(4), 15. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007053>
- EFSA, Ortiz Pelaez, A., Papanikolaou, A., & Stoicescu, A. V. (2020). *Guidance for reporting 2020 surveillance data on Transmissible Spongiform Encephalopathies (TSE) (2397-8325)*.
- European Food Safety, A., Arnold, M., Ru, G., Simmons, M., Vidal-Diez, A., Ortiz-Pelaez, A., & Stella, P. (2021). Scientific report on the analysis of the 2-year compulsory intensified monitoring of atypical scrapie. *EFSA J*, 19(7), e06686. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6686>
- Falsig, J., Nilsson, K. P., Knowles, T. P., & Aguzzi, A. (2008). Chemical and biophysical insights into the propagation of prion strains. *HFSP J*, 2(6), 332-341. <https://doi.org/10.2976/1.2990786>
- Fediaevsky, A., Maurella, C., Nöremark, M., Ingravalle, F., Thorgeirsdottir, S., Orge, L., Poizat, R., Hautaniemi, M., Liam, B., & Calavas, D. (2010). The prevalence of atypical scrapie in sheep from positive flocks is not higher than in the general sheep population in 11 European countries. *BMC Vet. Res*, 6(1), 1-13.
- Fediaevsky, A., Tongue, S. C., Noremark, M., Calavas, D., Ru, G., & Hopp, P. (2008). A descriptive study of the prevalence of atypical and classical scrapie in sheep in 20 European countries. *BMC Vet Res*, 4, 19. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-19>
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol*, 83(1), 29-40. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(73\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(73)90024-8)
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., & Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*, 126(1), 17-29. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0516>
- Gonzalez, L., Martin, S., & Jeffrey, M. (2003). Distinct profiles of PrPd immunoreactivity in the brain of scrapie-and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J. Gen. Virol*, 84(5), 1339-1350.
- Guere, M. E., Vage, J., Tharaldsen, H., Benestad, S. L., Vikoren, T., Madslie, K., Hopp, P., Rolandsen, C. M., Roed, K. H., & Tranulis, M. A. (2020). Chronic wasting disease associated with prion protein gene (PRNP) variation in Norwegian wild reindeer (*Rangifer tarandus*). *Prion*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/19336896.2019.1702446>
- Güere, M. E., Våge, J., Tharaldsen, H., Kvie, K. S., Bårdsen, B. J., Benestad, S. L., Vikøren, T., Madslie, K., Rolandsen, C. M., & Tranulis, M. A. (2022). Chronic wasting disease in

- Norway—A survey of prion protein gene variation among cervids. *Transbound Emerg Dis*, 69(4), e20-e31.
- Hill, A. F., & Collinge, J. (2003). Subclinical prion infection in humans and animals. *Br. Med. Bull*, 66(1), 161-170.
- Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Foster, J., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Grassi, J., & Hunter, N. (2006). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol*, 134(2-3), 171-181. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.003>
- John, T. R., Schatzl, H. M., & Gilch, S. (2013). Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay. *Prion*, 7(3), 253-258. <https://doi.org/10.4161/pri.24430>
- Kittelberger, R., Chaplin, M. J., Simmons, M. M., Ramirez-Villaescusa, A., McIntyre, L., MacDiarmid, S. C., Hannah, M. J., Jenner, J., Bueno, R., & Bayliss, D. (2010). Atypical scrapie/Nor98 in a sheep from New Zealand. *J. Vet. Diagn*, 22(6), 863-875.
- Lee, Y. H., Sohn, H. J., Kim, M. J., Kim, H. J., Lee, W. Y., Yun, E. I., Tark, D. S., Cho, I. S., & Balachandran, A. (2013). Strain characterization of the Korean CWD cases in 2001 and 2004. *J Vet Med Sci*, 75(1), 95-98. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0077>
- Mead, S., Lloyd, S., & Collinge, J. (2019). Genetic factors in mammalian prion diseases. *Annu Rev Genet*, 53(1), 117-147.
- Miller, M. W., & Williams, E. S. (2003). Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature*, 425(6953), 35-36. <https://doi.org/10.1038/425035a>
- Moazami-Goudarzi, K., Andréoletti, O., Vilotte, J.-L., & Béringue, V. (2021). Review on PRNP genetics and susceptibility to chronic wasting disease of Cervidae. *Vet. Res*, 52(1), 1-15.
- Nonno, R., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., D'Agostino, C., Vanni, I., Chiappini, B., Marcon, S., Riccardi, G., Tran, L., Vikoren, T., Vage, J., Madslie, K., Mitchell, G., Telling, G. C., Benestad, S. L., & Agrimi, U. (2020). Studies in bank voles reveal strain differences between chronic wasting disease prions from Norway and North America. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(49), 31417-31426. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013237117>
- Pirisinu, L., Tran, L., Chiappini, B., Vanni, I., Di Bari, M. A., Vaccari, G., Vikoren, T., Madslie, K. I., Vage, J., Spraker, T., Mitchell, G., Balachandran, A., Baron, T., Casalone, C., Rolandsen, C. M., Roed, K. H., Agrimi, U., Nonno, R., & Benestad, S. L. (2018). Novel Type of Chronic Wasting Disease Detected in Moose (*Alces alces*), Norway. *Emerg Infect Dis*, 24(12), 2210-2218. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180702>
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216(4542), 136-144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Robinson, A. L., Williamson, H., Güere, M. E., Tharaldsen, H., Baker, K., Smith, S. L., Pérez-Espona, S., Krojerová-Prokešová, J., Pemberton, J. M., & Goldmann, W. (2019). Variation in the prion protein gene (PRNP) sequence of wild deer in Great Britain and mainland Europe. *Vet. Res*, 50(1), 1-10.
- Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., & Raab, W. H. (2008). The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull*, 77(6), 343-355. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.09.012>

- Takada, L. T., Kim, M.-O., Metcalf, S., Gala, I. I., & Geschwind, M. D. (2018). Prion disease. *Handb. Clin. Neurol*, 148, 441-464.
- Tennant, J. M., Li, M., Henderson, D. M., Tyer, M. L., Denkers, N. D., Haley, N. J., Mathiason, C. K., & Hoover, E. A. (2020). Shedding and stability of CWD prion seeding activity in cervid feces. *PLoS One*, 15(3), e0227094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227094>
- Tranulis, M. A., Gavier-Widen, D., Vage, J., Noremark, M., Korpenfelt, S. L., Hautaniemi, M., Pirisinu, L., Nonno, R., & Benestad, S. L. (2021). Chronic wasting disease in Europe: new strains on the horizon. *Acta Vet Scand*, 63(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00606-x>
- [Record #438 is using a reference type undefined in this output style.]
- Wik, L., Mikko, S., Klingeborn, M., Steen, M., Simonsson, M., & Linne, T. (2012). Polymorphisms and variants in the prion protein sequence of European moose (*Alces alces*), reindeer (*Rangifer tarandus*), roe deer (*Capreolus capreolus*) and fallow deer (*Dama dama*) in Scandinavia. *Prion*, 6(3), 256-260. <https://doi.org/10.4161/pri.19641>
- Williams, E. S. (2005). Chronic wasting disease. *Vet Pathol*, 42(5), 530-549. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-530>
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, 16(1), 89-98. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.1.89>
- Williams, E. S., & Young, S. (1993). Neuropathology of chronic wasting disease of mule deer (*Odocoileus hemionus*) and elk (*Cervus elaphus nelsoni*). *Vet Pathol*, 30(1), 36-45. <https://doi.org/10.1177/030098589303000105>
- Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Gonzalez, L., Dagleish, M. P., Sirochman, T. M., Brown, J. C., Jeffrey, M., & Miller, M. W. (2007). PrPCWD in rectal lymphoid tissue of deer (*Odocoileus* spp.). *J Gen Virol*, 88(Pt 7), 2078-2082. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82342-0>

Supplementary material



Supplementary figure 1. Immunolabelling of PrP^{Sc} in moose and reindeer controls. Immunohistochemistry was performed on sections of CWD-positive reindeer brain (**A-B**, level of the obex) and tonsils (**C**), CWD-positive moose brain (**D**, level of the obex), CWD-negative moose (**E**, level of the cerebellum) and reindeer (**F**, level of the obex) with anti-PrP mAbs L42 and SAF84, as indicated. All sections were counterstained with haematoxylin. (Bar = 50 µm).

Estudio 4: Sleep disturbance in clinical and preclinical scrapie-infected sheep measured by polysomnography.

Abstract:

Neurodegenerative diseases are characterised by neuronal loss and abnormal deposition of pathologic proteins in the nervous system. Among the most common neurodegenerative diseases, we can find Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Huntington's disease and transmissible spongiform encephalopathies (TSEs).

Sleep disturbances and circadian rhythms are one of the most common symptoms in patients with neurodegenerative diseases. Currently, one of the main objectives of TSEs studies is try to establish early diagnosis, as clinical signs do not appear until damage to the central nervous system is well advanced, preventing any therapeutic approach. Here, we make the first description of sleep disturbances caused by scrapie in sheep. In this study, sleep disturbances in sheep affected by preclinical and clinical scrapie are evaluated by polysomnography in comparison with healthy controls. This is an innovative and non-invasive material in animal research that will allow us to investigate in depth the sleep/wake cycle of healthy sheep and sheep with scrapie. The results show a decrease in total sleep time as the disease progresses, and significant changes between control, clinical and preclinical animals. Results also show an increase in sleep fragmentation in clinical animals compared to preclinical and control animals. In addition, sheep with clinical scrapie show a total loss of REM sleep and alterations in NREM sleep compared to control sheep, demonstrating more shallow sleep. Although further research is needed, these results suggest that prion diseases also produce sleep disturbances in animals and that polysomnography could be a diagnostic tool of interest in clinical and preclinical cases of prion diseases.

Introduction

Scrapie in sheep is considered one of the most important transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) (Pattison & Jones, 1967). TSEs are caused by an unconventional agent called prion, an abnormal protein (PrP^{Sc}) that is generated by a conformational conversion of a cell surface glycoprotein (PrP^{C}) naturally present in the host. PrP^{Sc} is capable of inducing the transformation of the PrP^{C} to PrP^{Sc} , thus accumulating in the nerve tissue, slowly and without remission, until it causes the death of the individual. Prion diseases affect both humans and domestic and wild animals, and a total of sixteen different diseases have been described, seven in animals and nine in humans, all of which are characterised by a fatal outcome leading to the death of the individual (Imran & Mahmood, 2011).

Prion diseases share common neurodegenerative features with other neurodegenerative protein misfolding diseases like Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), dementia with Lewy bodies and Huntington's disease (HD) among others (Dobson, 2003). These neurodegenerative diseases are characterised by neuronal loss and abnormal deposition of proteins (phosphorylated α -synuclein, tau, β -amyloid, huntingtin or PrP^{Sc}) in the nervous system, mainly in the central nervous system (Scheckel & Aguzzi, 2018; Soto & Pritzkow, 2018). The origin of most neurodegenerative diseases is uncertain. Some of these diseases are idiopathic (Iranzo & Santamaria, 2015) and others are hereditary (Frisoni et al., 2022; Tanner et al., 1999), and prion diseases deserve special mention as they can be sporadic, hereditary or acquired (Imran & Mahmood, 2011).

A variety of neurological symptoms and signs, including dementia, parkinsonism (tremor, bradykinesia, postural rigidity and gait imbalance) (Braak et al., 2003), motor weakness, ataxia, cerebellar syndrome, dysautonomia, or oculomotor abnormalities, are typical of these diseases, which typically have a chronic and progressive course. In addition to all of them, sleep disturbances are among the most common clinical manifestations that have the greatest negative effects on the quality of life of those who experience them. As a result, because they appear before the beginning of the diseases' signature symptoms, sleep disturbances can be a crucial diagnostic sign that predicts the progression of the disease. (Hastings & Goedert, 2013; Ju et al., 2013; Kondratova & Kondratov, 2012; Lauretti et al., 2017; Lim et al., 2013; Mattis & Sehgal, 2016). The most commonly detected sleep disorders in neurodegenerative diseases are: insomnia (difficulty falling asleep, sleep fragmentation, early morning awakening), excessive daytime sleepiness, changes in circadian rhythm, rapid eye movement (REM) sleep behaviour disorder and nocturnal stridor (Barone et al., 2009; Dufort-Gervais et al., 2019; Hatfield et al., 2004; Morton et al., 2005; Weissova et al., 2016).

PrP^c has multiple roles in the body through different physiological processes. It has been implicated in cell survival and adhesion (Cazaubon et al., 2007). It has an important role in protection against oxidative stress and apoptosis (Kovacs & Budka, 2008; Westergard et al., 2007). In terms of its involvement in cell adhesion, PrP^c is involved in neuronal differentiation, epithelial and endothelial barrier integrity, transendothelial monocyte migration and T-lymphocyte activation (Castle & Gill, 2017; Cazaubon et al., 2007; Steele et al., 2006). In addition, PrP^c also appears to be involved in the regulation of autophagy (Shin et al., 2013), neurogenesis and neuritogenesis, as well as synaptogenesis, axonal development and white matter maintenance (Aguzzi et al., 2008), mitochondrial

homeostasis and signal transduction (Castle & Gill, 2017). In addition to this, it has been found to play an important role in the regulation of circadian rhythms and physiological sleep processes (da Luz et al., 2015; Martins & Brentani, 2002). As early as 1996, the first research directly linking the cellular prion protein to circadian rhythms and sleep showed that there were significant differences in sleep periods between PrP^c deprived mice and PrP^c mice. They suggested that loss of PrP^c leads to neurological dysfunction in at least one of the prion diseases such as fatal familial insomnia (FFI) (Tobler et al., 1996).

In this study, we have used sheep with scrapie as an animal model of neurodegenerative disease to study sleep patterns by polysomnography. The monitoring of animal activity by means of electroencephalography, electromyography and electrooculography is a breakthrough in the way of understanding the sleep/wake cycle in sheep as it represents the introduction of an innovative and non-invasive material in animal research that will allow us to thoroughly investigate the sleep/wake cycle of healthy sheep and sheep with scrapie. This will be of great help for future treatments to improve the quality of life of individuals.

Materials and Methods

Animals:

Fifteen female animals aged 4-5 years were selected from local herds with severe scrapie problems on their farm. They were divided into three groups of 5 sheep each: 5 clinical sheep naturally infected with scrapie; 5 preclinical sheep naturally infected with scrapie; and 5 negative control sheep.

To carry out this selection, biopsies of the lymphoid tissue associated with the rectal mucosa were performed, using anti prion protein antibodies (Gonzalez et al., 2005) to establish whether the sheep were preclinical. With the animal's hind limbs raised, a speculum was introduced through the anus to visualise the rectal columns. In this position, the target lymphoid tissue was removed with the aid of forceps and scissors. The removed tissue (approximately 8 mm in size) was fixed in formalin for subsequent detection of PrP^{Sc} by immunohistochemistry. Animals in the clinical stage were identified by the observation of scrapie associated clinical signs, which included pruritus and scratching of the tail root, lumbar area, and limbs, neurological signs, such as ataxia and head tremors, teeth grinding, wool loss, and cachexia. Clinical and preclinical animals were confirmed to be scrapie-positive by the detection of PrP^{Sc} in the brain by immunohistochemical analyses. Negative animals came from a scrapie-free herd, and their negativity was confirmed by ELISA tests.

Genotyping:

All the animals displayed a *PRNP* gene genotype ARQ/ARQ.

For genotyping, blood samples were taken from the jugular vein using vacuum tubes with EDTA as anticoagulant. Subsequently, DNA was extracted using genomic DNA purification kits from blood (e.g. GFXTM Genomic from Amersham Pharmacia Biotech Inc.).

The PCR technique based on previous studies (Acutis et al., 2006) was used to carry out ORF amplification, with a number of modifications as detailed below.

The open reading frame (ORF) of *PRNP* gene (750 bp) of all animals was amplified from the genomic DNA with forward and reverse gene-specific primers. The reaction was performed using the reagents of the commercial kit of QIAGEN® Taq PCR Core Kit. The polymerase chain reaction (PCR) was performed in a final volume of 50 µl which contained 20 pmol of each primer, 5 ul of 10x PCR Buffer, 10 ul of 5x Q-Solution Buffer, 1ul of dNTP mix (10 mM), and 2,5 U of Taq DNA polymerase. The following PCR conditions were used: denaturation at 94°C for 2 min, 35 amplification cycles of denaturation at 94°C for 45 secs, annealing at 58°C for 45 secs, and extension at 72°C for 1 min 30 sec; followed by a final 5–10 min extension at 72°C. PCR was performed using an S-1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, California, USA). Once the PCR was completed, all PCR products were analysed by electrophoresis on a 1.0% agarose gel stained to verify that the gene had been correct. Amplified PCR reactions were purified using the vacuum manifold from Millipore® at 24 Hg of pressure for 3 minutes. Once the amplified DNA was purified, it was sent to be sequenced together with the primers corresponding to the company Stab-Vida in Portugal. Chromatograms were analysed using Chromas 2.6.6. (Technelysium Pty Ltd, Australia).

Sleep/wake cycle monitoring

For monitoring the sleep/wake cycle in sheep, the Embletta MPR PG XS system was available together with the Ambulatory Polysomnography Module already used by several authors for sleep monitoring in humans. This device is designed to perform ambulatory studies by means of a PC-USB cable connection. By using this device, we simultaneously performed electroencephalography (EEG), electromyography (EMG) and electro-oculography (EOG) measurements. Electrodes to measure eye movements were

placed on top of each eye, and the two electrodes for measuring muscle activity on the submandibular muscles (Figure 1B). These electrodes were attached to the skin of the sheep by means of cyanoacrylate. For electroencephalographic measurement, two electrodes were placed on the front of the sheep's skull, corresponding to Reference and Ground. Two more electrodes were placed on the mastoid bone behind each ear. On the medial side of the head, C3 and C4 were placed and just below Occipital 1 and 2 were placed. (Figure 1A). The sleep recordings were conducted once for 12 hours, from 8pm to 8am.

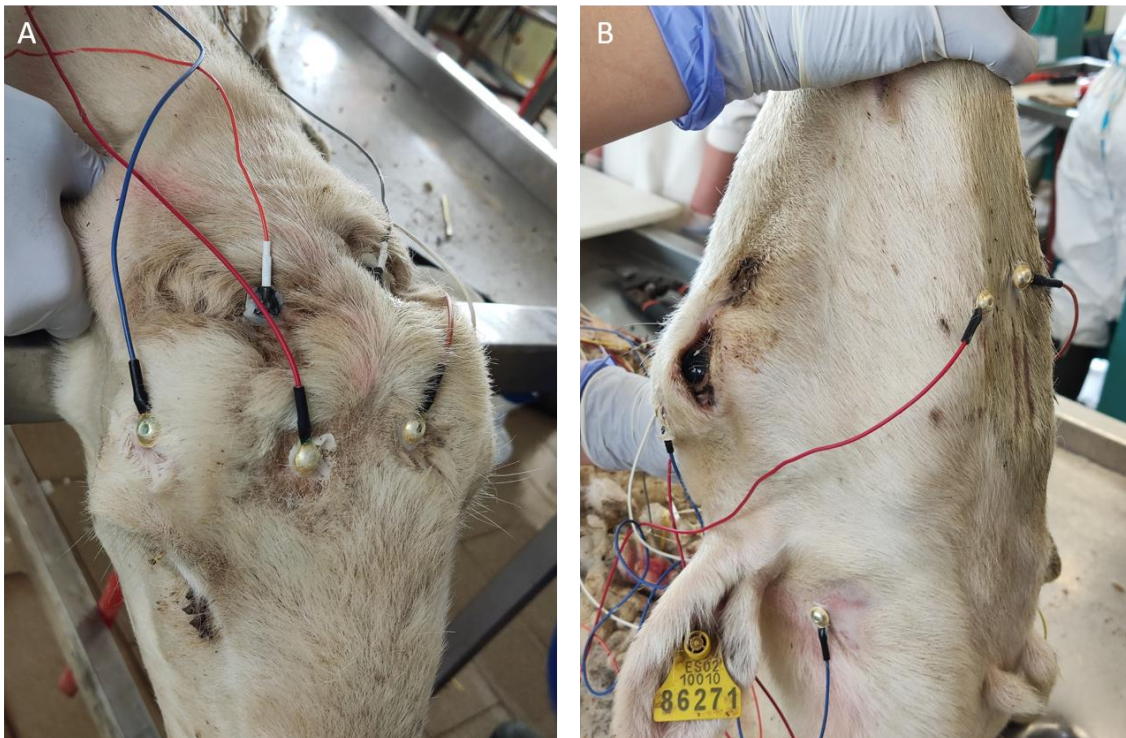


Figure 1. Electrode distribution on the sheep's head

Data analysis and statistics

GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA) software was used for the statistical analyses. Graphs were generated with GraphPad Prism 8.0 (San Diego, CA, USA). All quantitative data were tested for normality with the Shapiro–Wilk test. Between-group differences

in electroencephalography, electrooculography and electromyography scores were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni *post hoc* test. Differences between groups were considered significant at $p < 0.05$.

Results

Sleep-wake patterns of clinical and preclinical scrapie sheep differ from those of healthy control sheep:

Polysomnography showed that sheep spend most of their resting time awake, since control sheep, i.e. healthy sheep, spent 73% of their resting time awake (525 minutes). Clinically scrapie-affected animals spent the most time awake at 85% of the total (606 minutes), closely followed by pre-clinical sheep at 81% (590 minutes) (Figure 2A and 2B). Total recording time was 720 minutes. Statistically significant differences were detected between control and clinical animals in the percentage of total awake time ($p < 0.01$). Statistically significant differences were also detected between control and preclinical animals ($p < 0.05$). No differences were found between preclinical and clinical animals (Figure 2A).

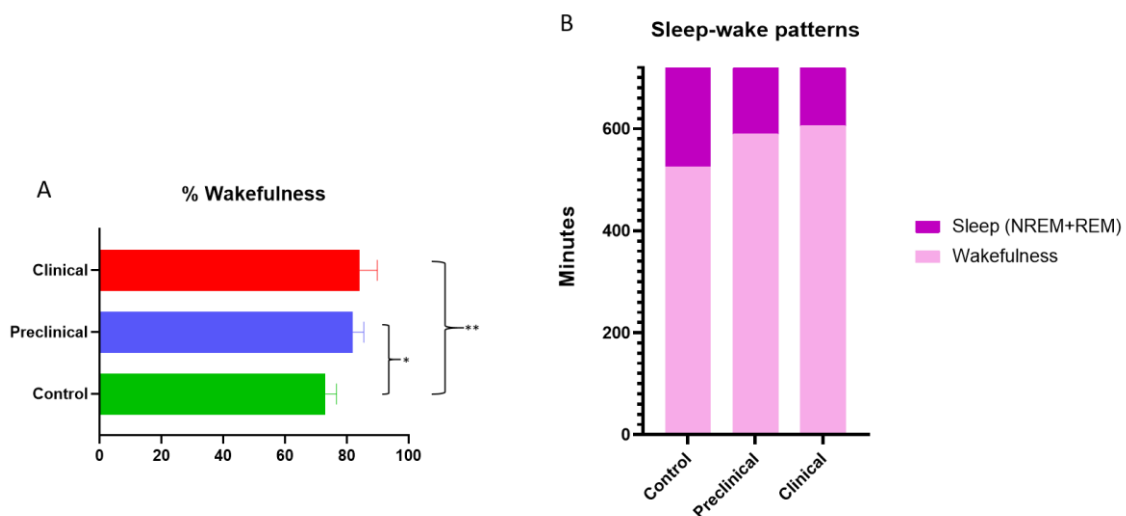


Figure 2. Sleep-wake patterns A: Percentage of wakefulness. The graph shows the total percentage of wakefulness of the different groups of animals over the course of a night.

Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). **B: Sleep-wake patterns.** The graph shows the total minutes of wakefulness and sleep (NREM+REM) of the different groups of animals over the course of a night.

Clinical scrapie sheep have increased sleep fragmentation.

When analysing the number of sleep-wake cycles, i.e. the number of sleep fragmentations in each group of sheep, it was observed that control sheep had an average of eight sleep fragmentations during the night, preclinical sheep had eleven and clinical sheep had fourteen sleep fragmentations (Figure 3A and 3B). Statistically significant differences were detected between control and clinical animals in the number of sleep fragmentations that occurred in a night ($p < 0.01$). Significant differences were also detected between preclinical and clinical animals ($p < 0.05$). No differences were found between control and preclinical animals (Figure 3A).

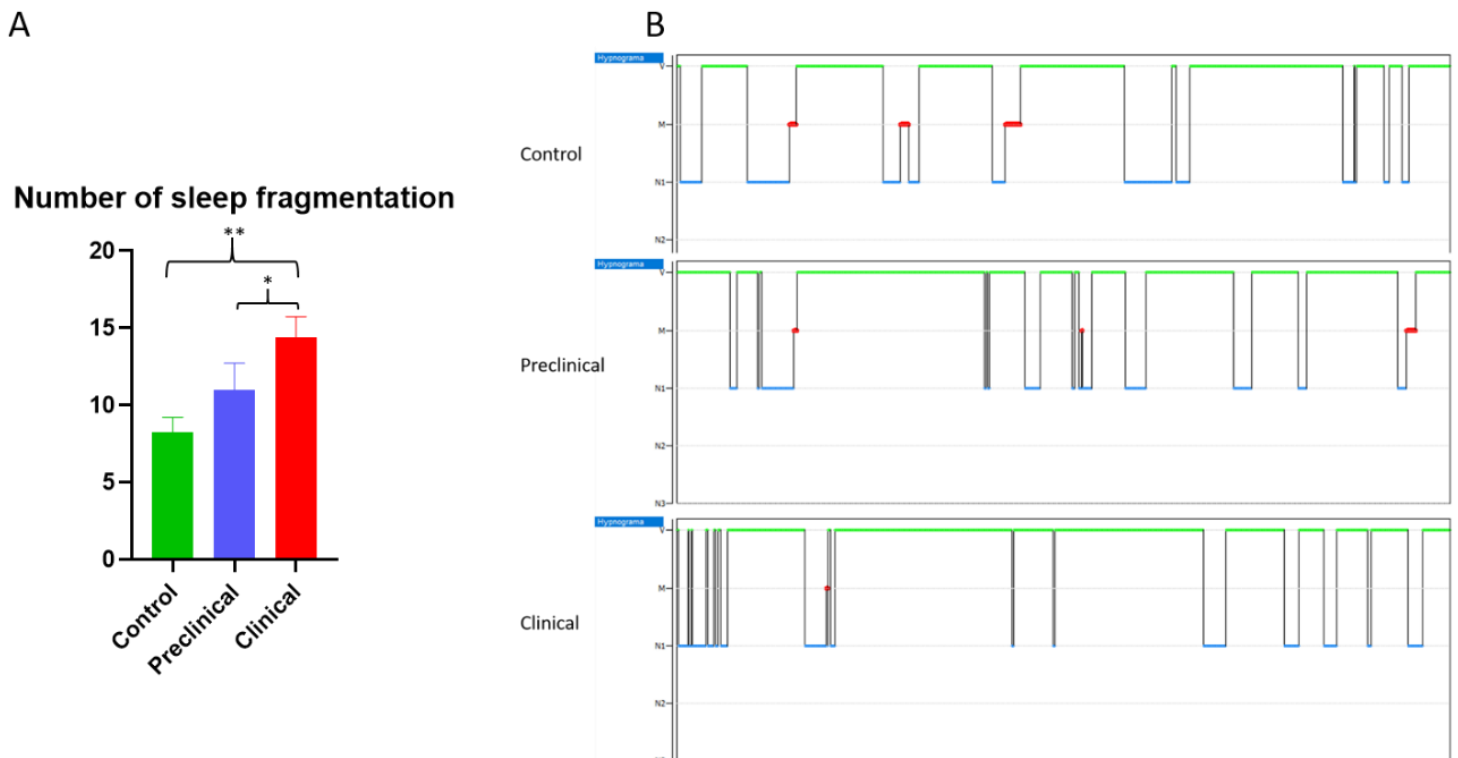


Figure 3. Sleep fragmentations. A: Number of sleep fragmentations. The graph shows the average sleep fragmentations of the different groups of animals over the course of a night.

Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). **B: Hypnogram.** Shows the different phases of sleep in the three different groups of sheep. The wakefulness is shown in green, the NREM sleep phase in blue and the REM sleep phase in red.

Clinical and preclinical scrapie sheep show alterations in NREM and REM sleep compared to control sheep.

In sheep, sleep was divided into 2 clearly differentiated types of sleep in sheep, NREM sleep, and REM sleep. The % of NREM sleep obtained by polysomnography shows that sheep with clinical scrapie have about 100% of their sleep in the NREM phase. Preclinical ewes have 95% compared to control sheep with 86% (Figure 4A). Statistically significant differences were detected between control and clinical animals in the percentage of total NREM sleep time ($p < 0.01$). Statistically significant differences were also found between control and preclinical animals ($p < 0.05$). No differences were found between preclinical and clinical animals (Figure 4A).

The % of REM sleep obtained by polysomnography shows that clinical scrapie sheep have virtually no REM sleep (1 minute). Preclinical sheep have around 5% (7 minutes) REM sleep followed by control sheep with 13% (24 minutes) (Figure 4B and 4C). Statistically significant differences were detected between control and clinical animals in terms of percentage of total REM sleep time ($p < 0.01$). Statistically significant differences were also found between control and preclinical animals ($p < 0.05$). No differences were found between preclinical and clinical animals (Figure 4B).

Estudio 4

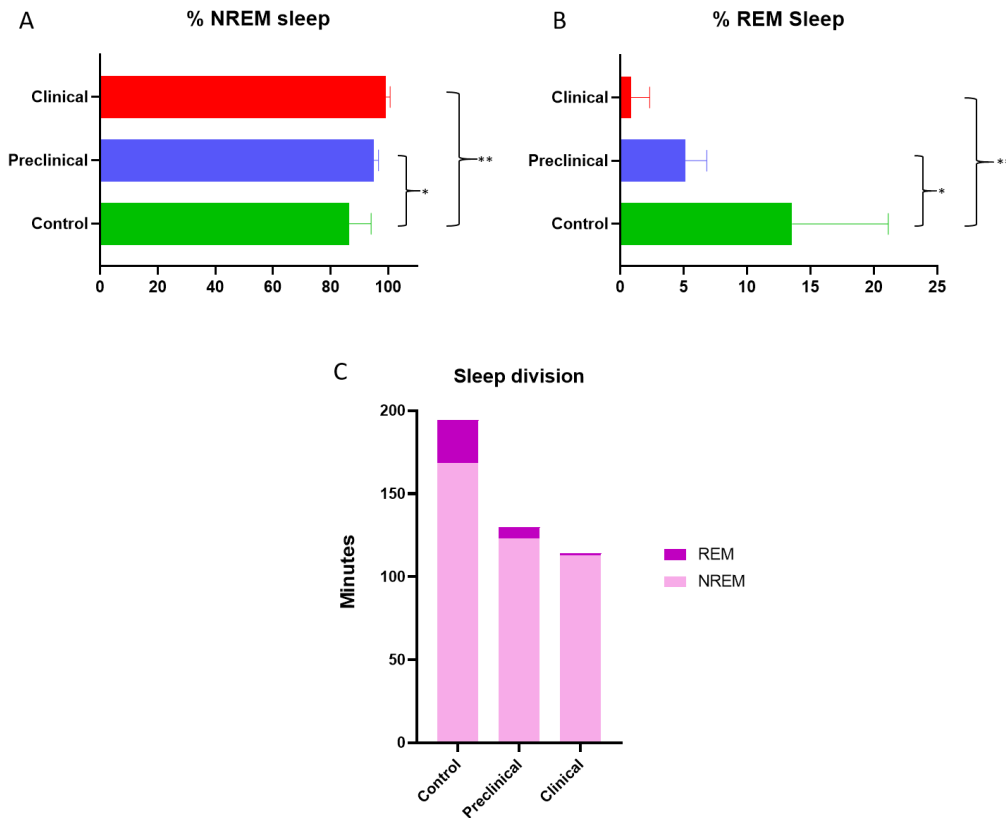


Figure 4. Alterations in NREM and REM sleep. A: Percentage of NREM sleep. The graph shows the total percentage of NREM sleep within the total sleep of the different groups of animals over the course of a night. **B: Percentage of REM sleep.** The graph shows the total percentage of REM sleep within the total sleep of the different groups of animals over the course of a night. Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$). **C: Sleep division.** The graph shows the division of sleep in minutes.

EEG delta frequency distributions during NREM sleep are altered in clinical scrapie sheep.

The EEG frequency distribution was fully examined using classical frequency bands and the Delta frequency was established as a reference. Delta frequencies are analysed to determine whether NREM sleep is lighter or deeper.

Delta frequencies between control and preclinical sheep were very similar, around 70%. Clinical sheep had an average Delta frequency of 64%. Statistically significant differences were detected between control and clinical animals in terms of the total percentage of Delta frequencies ($p < 0.01$). No differences were found between pre-clinical and clinical animals nor between control and pre-clinical animals (Figure 5).

% Delta frequencies in NREM sleep

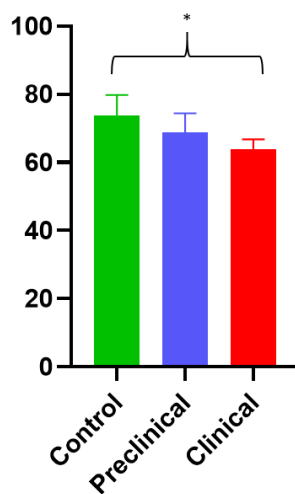


Figure 5. Percentage of Delta frequencies in NREM sleep. The graph shows the total percentage of delta frequencies within NREM sleep for different groups of animals over the course of a night. Evaluation of differences between groups was performed using the one-way ANOVA test followed by the Bonferroni *post hoc* test (* $p < 0.05$).

Discussion

Sleep-wake disorders are a major source of morbidity and negatively affect the quality of life of neurodegenerative disease patients. The disorders may occur during the prodromal stage of the disease, years before the onset of the cardinal symptoms that define the diagnosis of the disease (Abbott & Videnovic, 2016; Hastings & Goedert, 2013; Kondratova & Kondratov, 2012; Mattis & Sehgal, 2016). This finding indicates that

early identification of these disorders could be of great interest when neuroprotective treatments are available.

PrP^c plays a role key in a biochemical pathway that affects several physiological processes. There are several animal models of PrP^c dysfunction or PrP^c knockout, in which marked alterations in circadian rhythms occur (Tobler et al., 1996), suggesting that PrP^c plays an important role in one of the most essential processes for life: sleep/wakefulness.

This is the first study to provide a detailed comparison of sleep-wake patterns and the distribution of EEG spectra in healthy and scrapie-infected sheep. Sheep have a number of advantages over other species for studying the neurobiology of sleep. They have a human-like brain anatomy with convoluted cortexes, they are diurnal and their sleep structure is more similar to that of humans than rodents (Toth & Bhargava, 2013). In addition, extended life expectancy is particularly useful when studying late onset diseases such as prion diseases. Their husbandry and welfare are easily managed (Morton & Howland, 2013). Another important factor for using sheep in our study is that the sleep-wake pattern and EEG signatures are similar to those observed in humans and non-human primates (Hsieh et al., 2008). In addition, scrapie is the prototypical prion disease in animals, as it has been the subject of the largest number of studies in TSEs (Zabel & Reid, 2015).

Polysomnography results have shown that sheep do not excel at sleeping in quantity. Control sheep spent 73% of the night awake. Clinical sheep spent more time awake during the night than preclinical sheep and much more time awake than healthy sheep, suggesting that their response to sleep pressure is abnormal. It is becoming increasingly

evident that chronic neurodegenerative diseases are commonly accompanied by sleep dysfunction and may appear even several years before the main symptoms (Ju et al., 2014; Schrempf et al., 2014). In a study carried out in 2016, all patients with fCJD showed sleep abnormalities, including increased periods of night-time wakefulness (Givaty et al., 2016).

When assessing the number of sleep fragmentations, it was observed that clinical sheep had a significantly higher number of sleep fragmentations during the night compared to control and preclinical sheep. It has been shown that rhesus monkeys infected with kuru show sleep fragmentation during the night (Bert et al., 1978). It has also been observed that mice inoculated with murine prions show sleep fragmentation very early in the incubation period (Steele et al., 2007).

Clinical and preclinical scrapie sheep showed alterations in NREM and REM sleep compared to control sheep. In the clinical sheep, a total loss of REM sleep was observed. In the case of the preclinical sheep, a significant decrease in REM sleep was also demonstrated. In the case of Parkinson's disease, REM sleep disturbance is described even decades before the development of synucleinopathy (Postuma et al., 2013). In prion diseases, a total loss of REM sleep is described in rhesus monkeys infected with kuru (Bert et al., 1978) All patients with fCJD present with loss and decrease of REM sleep (Givaty et al., 2016). In addition, recently in 2022, a CJD patient was observed to have severe REM sleep disturbance 5 years before the disease onset (El Sammak et al., 2022).

Analysis of normalised EEG showed less content in delta frequencies in clinical scrapie sheep than in control sheep, this result suggests that the NREM sleep of clinical sheep is

much shallower than that of control sheep. In previous experiments in which monkeys were infected with Kuru, they also observed that NREM sleep became increasingly lighter (Bert et al., 1978). Delta-wave disruption is a key early event in HD mouse models (Burgold et al., 2019). Shallow sleep without solid periods of slow-wave sleep has also been observed in patients with fCJD, leading to abnormal sleep (Givaty et al., 2016).

In Gerstmann-Sträussler-Sheinker disease, no sleep disturbances have been reported in patients suffering from the disease (Provini et al., 2009). This suggests that sleep disturbances are specific to some prion diseases, maybe related to the different strains causing them, which is a field that still needs much research to clarify the role of the pathological prion protein in normal sleep function.

One of the main objectives of TSE studies is to try to perform an early diagnosis of these diseases, as clinical signs do not appear until the nervous damage is very advanced, which prevents any therapeutic approach. This is why preclinical biomarker studies in TSEs are of great relevance. Our main objective was to try to determine the possible alterations that prion diseases can produce in sleep and to evaluate the possible use of polysomnography as a diagnostic tool, as it provides a non-invasive and objective measure of cortical brain activity. This study is the first approach to the alterations produced by scrapie in the sleep/wake cycle in sheep. We have observed that clinical sheep have a poorer quality of sleep, as the total percentage of sleep is lower, with a high fragmentation of sleep, less deep NREM sleep and a complete disappearance of REM sleep. In the case of preclinical sheep, they also have milder sleep disturbances. These results are a good starting point for further research into sleep disturbances

related to prion diseases. All of this will be fundamental in the search for treatments to improve these sleep disorders and try to prolong the quality of life of the individual.

Ethics statement

All animal experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experiments of the University of Zaragoza (permit number PI17/21).

References

- Abbott, S. M., & Videnovic, A. (2016). Chronic sleep disturbance and neural injury: links to neurodegenerative disease. *Nat Sci Sleep*, *8*, 55.
- Acutis, P. L., Bossers, A., Priem, J., Riina, M., Peletto, S., Mazza, M., Casalone, C., Forloni, G., Ru, G., & Caramelli, M. (2006). Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks. *J. Gen. Virol*, *87*(4), 1029-1033.
- Aguzzi, A., Baumann, F., & Bremer, J. (2008). The prion's elusive reason for being. *Annu. Rev. Neurosci.*, *31*, 439-477.
- Barone, P., Antonini, A., Colosimo, C., Marconi, R., Morgante, L., Avarello, T. P., Bottacchi, E., Cannas, A., Ceravolo, G., & Ceravolo, R. (2009). The PRIAMO study: a multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *J. Mov. Disord*, *24*(11), 1641-1649.
- Bert, J., Vuillon-Cacciuttolo, G., Balzamo, E., De Micco, P., Gambarelli, D., Tamalet, J., & Gastaut, H. (1978). Experimental kuru in the rhesus monkey: A study of eeg modifications in the waking state and during sleep. *Electroencephalogr. clin. neurophysiol*, *45*(5), 611-620.
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A., Steur, E. N. J., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, *24*(2), 197-211.
- Burgold, J., Schulz-Trieglaff, E. K., Voelkl, K., Gutiérrez-Ángel, S., Bader, J. M., Hosp, F., Mann, M., Arzberger, T., Klein, R., & Liebscher, S. (2019). Cortical circuit alterations precede motor impairments in Huntington's disease mice. *Sci. Rep*, *9*(1), 6634.
- Castle, A. R., & Gill, A. C. (2017). Physiological functions of the cellular prion protein. *Front. Mol. Biosci.*, *4*, 19.
- Cazaubon, S., Viegas, P., & Couraud, P.-O. (2007). Fonctions de la protéine prion PrP^C. *médecine/sciences*, *23*(8-9), 741-745.
- da Luz, M. H., Peres, I. T., Santos, T. G., Martins, V. R., Icimoto, M. Y., & Lee, K. S. (2015). Dopamine induces the accumulation of insoluble prion protein and affects autophagic flux. *Front Cell Neurosci*, *9*, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00012>
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, *426*(6968), 884-890.
- Dufort-Gervais, J., Mongrain, V., & Brouillette, J. (2019). Bidirectional relationships between sleep and amyloid-beta in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem*, *160*, 108-117.
- El Sammak, S., Attarian, H., Taype-Roberts, C., & Standlee, J. (2022). REM sleep behavior disorder as a remote precedent to Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurol. Sci*, *43*(9), 5647-5649.
- Frisoni, G. B., Altomare, D., Thal, D. R., Ribaldi, F., van der Kant, R., Ossenkoppele, R., Blennow, K., Cummings, J., van Duijn, C., & Nilsson, P. M. (2022). The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nat. Rev. Neurosci*, *23*(1), 53-66.
- Givaty, G., Maggio, N., Cohen, O. S., Blatt, I., & Chapman, J. (2016). Early pathology in sleep studies of patients with familial Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Sleep Res*, *25*(5), 571-575.
- Gonzalez, L., Jeffrey, M., Siso, S., Martin, S., Bellworthy, S. J., Stack, M. J., Chaplin, M. J., Davis, L., Dagleish, M. P., & Reid, H. W. (2005). Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Vet Rec*, *156*(26), 846-847. <https://doi.org/10.1136/vr.156.26.846-b>
- Hastings, M. H., & Goedert, M. (2013). Circadian clocks and neurodegenerative diseases: time to aggregate? *Curr. Opin. Neurobiol*, *23*(5), 880-887.
- Hatfield, C. F., Herbert, J., Van Someren, E., Hodges, J., & Hastings, M. (2004). Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain*, *127*(5), 1061-1074.
- Hsieh, K.-C., Robinson, E. L., & Fuller, C. A. (2008). Sleep architecture in unrestrained rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) synchronized to 24-hour light-dark cycles. *Sleep*, *31*(9), 1239-1250.

- Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virology*, 8, 559. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-559>
- Iranzo, A., & Santamaria, J. (2015). Sleep in neurodegenerative diseases. *Sleep Medicine: A Comprehensive Guide to Its Development, Clinical Milestones, and Advances in Treatment*, 271-283.
- Ju, Y.-E. S., Lucey, B. P., & Holtzman, D. M. (2014). Sleep and Alzheimer disease pathology—a bidirectional relationship. *Nat. Rev. Neurol.*, 10(2), 115.
- Ju, Y.-E. S., McLeland, J. S., Toedebusch, C. D., Xiong, C., Fagan, A. M., Duntley, S. P., Morris, J. C., & Holtzman, D. M. (2013). Sleep quality and preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol.*, 70(5), 587-593.
- Kondratova, A. A., & Kondratov, R. V. (2012). The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci.*, 13(5), 325.
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2008). Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol.*, 172(3), 555-565. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070442>
- Lauretti, E., Di Meco, A., Merali, S., & Praticò, D. (2017). Circadian rhythm dysfunction: a novel environmental risk factor for Parkinson's disease. *Mol. Psychiatry*, 22(2), 280-286.
- Lim, A. S., Kowgier, M., Yu, L., Buchman, A. S., & Bennett, D. A. (2013). Sleep fragmentation and the risk of incident Alzheimer's disease and cognitive decline in older persons. *Sleep*, 36(7), 1027-1032.
- Martins, V. R., & Brentani, R. R. (2002). The biology of the cellular prion protein. *Neurochem Int.*, 41(5), 353-355. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00054-2](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00054-2)
- Mattis, J., & Sehgal, A. (2016). Circadian rhythms, sleep, and disorders of aging. *Trends Endocrinol.*, 27(4), 192-203.
- Morton, A. J., & Howland, D. S. (2013). Large genetic animal models of Huntington's disease. *J Huntingtons Dis.*, 2(1), 3-19.
- Morton, A. J., Wood, N. I., Hastings, M. H., Hurelbrink, C., Barker, R. A., & Maywood, E. S. (2005). Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *J. Neurosci.*, 25(1), 157-163.
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec.*, 80(1), 2-9. <https://doi.org/10.1136/vr.80.1.2>
- Postuma, R. B., Gagnon, J.-F., & Montplaisir, J. (2013). Rapid eye movement sleep behavior disorder as a biomarker for neurodegeneration: the past 10 years. *Sleep Med.*, 14(8), 763-767.
- Provini, F., Vetrugno, R., Pierangeli, G., Cortelli, P., Rizzo, G., Filla, A., Strisciuglio, C., Gallassi, R., & Montagna, P. (2009). Sleep and temperature rhythms in two sisters with P102L Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) disease. *Sleep Med.*, 10(3), 374-377.
- Scheckel, C., & Aguzzi, A. (2018). Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat. Rev. Genet.*, 19(7), 405-418.
- Schrempf, W., Brandt, M. D., Storch, A., & Reichmann, H. (2014). Sleep disorders in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis.*, 4(2), 211-221.
- Shin, H. Y., Oh, J. M., & Kim, Y. S. (2013). The Functional Role of Prion Protein (PrP^C) on Autophagy. *Pathogens*, 2(3), 436-445. <https://doi.org/10.3390/pathogens2030436>
- Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.*, 21(10), 1332-1340.
- Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., & Macklis, J. D. (2006). Prion protein (PrP^C) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(9), 3416-3421. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511290103>
- Steele, A. D., Jackson, W. S., King, O. D., & Lindquist, S. (2007). The power of automated high-resolution behavior analysis revealed by its application to mouse models of Huntington's and prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 104(6), 1983-1988.

Estudio 4

- Tanner, C. M., Ottman, R., Goldman, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., & Langston, J. W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. *Jama*, *281*(4), 341-346.
- Tobler, I., Gaus, S., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rülicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P., & Manson, J. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, *380*(6575), 639.
- Toth, L. A., & Bhargava, P. (2013). Animal models of sleep disorders. *Comp. Med*, *63*(2), 91-104.
- Weissova, K., Bartoš, A., Sládek, M., Novakova, M., & Sumová, A. (2016). Moderate changes in the circadian system of Alzheimer's disease patients detected in their home environment. *PLoS One*, *11*(1), e0146200.
- Westergard, L., Christensen, H. M., & Harris, D. A. (2007). The cellular prion protein (PrPC): its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis BBA-MOL BASIS DIS*, *1772*(6), 629-644.
- Zabel, M. D., & Reid, C. (2015). A brief history of prions. *Pathog. Dis.*, *73*(9).

DISCUSIÓN GENERAL

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas son enfermedades neurodegenerativas progresivas y mortales causadas por proteínas transformadas del huésped denominadas priones (partículas infecciosas proteicas). Los priones se forman por el mal plegamiento de la proteína priónica (PrP^{C}) celular normal del huésped en la isoforma asociada a la enfermedad, PrP^{res} , "res" denota resistencia al tratamiento con proteinasa K (PK). Debido a su resistencia a la degradación por proteasas, los priones se acumulan como agregados fibrilares en el sistema nervioso central, provocando cambios neurodegenerativos y, en última instancia, la muerte (Prusiner, 1998). Este mal plegamiento depende de la cadena de aminoácidos que componen la proteína, y por lo tanto del gen encargado de codificarla, el gen *PRNP* (Hunter, 1997).

Durante los años 80, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) afectó a los humanos con la aparición de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) (Bruce et al., 1997). Posteriormente, en el año 2005 se detectó en Francia el primer caso de EEB natural en cabras (Eloit et al., 2005), que se repetiría años después (Spiropoulos et al., 2011). Estos hallazgos sugieren que la EEB caprina podría suponer un riesgo potencial para la salud humana, lo que implicó una revisión de las estrategias de control con el objetivo de evitar la transmisión del agente bovino a los humanos a través de la cabra. Posteriormente se ha trabajado en la búsqueda de polimorfismos en el gen *PRNP* que pudieran estar implicados en la resistencia y susceptibilidad de las cabras a las EET. Se han llevado a cabo estudios experimentales valorando la transmisión oral de EEB caprina en cabras portadoras de las mutaciones R/Q211 y Q/K222 demostrando que, mientras el polimorfismo R/Q211 amplía el periodo de incubación, solo el alelo K222 parece tener un efecto protector tras la infección oral (Aguilar-Calvo et al., 2015) lo que

sugiere que este polimorfismo es un buen candidato para establecer un programa de mejora genética con el objetivo de erradicar la EEB caprina. En el año 2011 se demostró que los aislados de EEB ovina y caprina mostraban una mayor eficiencia de transmisión en comparación con la EEB bovina (Padilla et al., 2011). Por ello en nuestro primer estudio, se ha evaluado mediante un bioensayo en ratones transgénicos humanos la infectividad de tejidos y fluidos caprinos provenientes de cabras (con diferentes genotipos en el codón 222) inoculadas intracerebralmente con EEB caprina y EEB bovina lo que ha permitido observar que los aislados de obex con EEB caprina mostraron una mayor capacidad de transmisión al modelo Tg340 que los que contenían EEB bovina. Esto, se había demostrado anteriormente en un estudio en el que se compararon las características de transmisión de la EEB bovina, ovina y caprina en dos modelos diferentes de ratones transgénicos que expresan PrP humana (líneas Tg650 y Tg340) (Padilla et al., 2011). Este hecho también ha sido descrito por numerosos autores que sugieren una barrera de transmisión muy potente pero no total (Asante et al., 2002; Bishop et al., 2006; Kong et al., 2008). Esta barrera de transmisión entre humanos y bovinos podría ser una explicación de la baja incidencia de la vECJ, teniendo en cuenta el elevado número de personas que estuvieron expuestas al agente de la EEB durante la década de los años 80. En el caso de la EEB caprina, las tasas de ataque en nuestro estudio rondaron el 100%, tal y como fue descrito anteriormente (Padilla et al., 2011). Todos estos datos sugieren una barrera de transmisión aparentemente menor o nula para la EEB caprina en ratones transgénicos con PrP humana.

En lo que se refiere a las características neuropatológicas observadas en los ratones Tg340 inoculados con aislados de EEB caprina y bovina, demostraron una distribución de PrP^{Sc} similar a la observada en los encéfalos de ratones humanizados

infectados con vECJ (Béringue et al., 2008). Mediante Western Blot se observó que los aislados de EEB bovina y caprina mostraron un patrón de bandas de PrP^{vCJD} típico (Béringue et al., 2008).

En cuanto al genotipo de las cabras, los inóculos de obex con EEB caprina procedentes de cabras homocigotas glutamina (Q/Q) en el codón 222 mostraron una tasa de ataque más elevada que los inóculos de obex con EEB caprina procedentes de cabras heterocigotas glutamina/lisina (Q/K) y homocigotas lisina (K/K). El polimorfismo K222 destaca por ser de gran importancia en términos de resistencia a las enfermedades priónicas. Lacroux y colaboradores demostraron en 2014 una fuerte resistencia de las cabras frente al agente del scrapie administrado por vía oral (Caroline Lacroux et al., 2014). Ese mismo año, Aguilar-Calvo demostró en un estudio con ratones transgénicos portadores del alelo Q222, una susceptibilidad total a la infección por scrapie y EEB, mientras que los ratones que expresaban el alelo K222 eran resistentes a todos los aislados de EEB bovina y scrapie, siendo susceptibles únicamente al aislado de EEB caprina (Aguilar-Calvo et al., 2014). A excepción de los inóculos procedentes de obex, no se encontró PrP^{Sc} mediante las técnicas de diagnóstico convencionales en los restantes tejidos y fluidos de los animales inoculados. Sin embargo, utilizando la técnica de la amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (protein misfolding cyclic amplification, PMCA), se detectó amplificación priónica en los encéfalos de ratones Tg340 subclínicos inoculados con tejidos de cabra que habían sido negativos por pruebas convencionales. Sólo los encéfalos de los ratones inoculados con tejidos de cabras infectadas con EEB caprina mostraron amplificación de priones por PMCA, en contraste con los ratones inoculados con tejidos de cabras infectadas con EEB bovina. Todo ello apoya la teoría de que la eficiencia de transmisión de los priones de la EEB a los humanos se ve

incrementada por un paso intermedio en las cabras (Padilla et al., 2011). La mayoría de los ratones Tg340 positivos detectados por PMCA fueron los inoculados con tejidos de cabras homocigotas glutamina (Q/Q) en el codón 222, seguidos de los inoculados con tejidos de cabras heterocigotas glutamina/lisina (Q/K) y, por último, de los inoculados con tejidos de cabras homocigotas lisina (KK). En el caso de las cabras que expresaban el genotipo Q222Q, se observó una mayor distribución periférica del prion, detectándose una amplificación en ratones inoculados con músculo semitendinoso, músculo tríceps braquial, hígado y también con sangre total. Las cabras que expresaban los genotipos Q222K y K222K mostraron una menor distribución periférica de PrP^{Sc}. Estas diferencias podrían estar asociadas a las interacciones entre el agente infeccioso y los factores específicos del hospedador, siendo el genotipo del gen *PRNP* uno de los principales de ellos. Como se ha demostrado en ovejas con scrapie, el genotipo del gen *PRNP* influye fuertemente en el tropismo y la distribución de los depósitos de PrP. Las ovejas con genotipos susceptibles muestran una mayor distribución periférica de PrP^{Sc} en comparación con las ovejas con genotipos resistentes (Andréoletti et al., 2000; Ersdal et al., 2003; Gonzalez et al., 2012; Jeffrey et al., 2002). Las cabras que expresan el aminoácido metionina (M) en el codón 142, evidencian una menor incidencia de scrapie y una menor tendencia a acumular PrP^{Sc} fuera del SNC en comparación con las homocigotas isoleucina (I) (González et al., 2009). Dado que no se detectaron signos de enfermedad ni depósitos de PrP^{Sc} en los ratones mediante técnicas de diagnóstico convencionales, la detección de PrP^{Sc} mediante PMCA podría deberse a la amplificación de PrP^{Sc} de los inóculos originales utilizados para el bioensayo. Sin embargo, este hallazgo también podría deberse a la propagación, a niveles bajos, de los priones presentes en los tejidos caprinos inoculados en los ratones Tg340. Al analizar los

encéfalos de los ratones inoculados con tejidos negativos como músculo semitendinoso, músculo tríceps braquial e hígado, y fluidos como sangre entera, leucocitos, leche crema, suero de la leche y células de la leche, sólo los procedentes de ratones inoculados con EEB caprina mostraron amplificación mediante PMCA. En cambio, los encéfalos de los ratones infectados con EEB bovina no mostraron amplificación. Como se ha mencionado anteriormente, la EEB caprina tiene una mayor capacidad de transmisión a los modelos murinos transgénicos humanos, por lo que podría haberse producido una transmisión verdadera de la EEB caprina a los ratones tg340. Para dilucidar si hubo una acumulación real de PrP^{Sc} en los encéfalos de los ratones tg340, se están analizando actualmente los inóculos utilizados en el bioensayo mediante PMCA y se está llevando a cabo un bioensayo utilizando los encéfalos de todos los animales positivos por PMCA. En resumen, nuestro estudio sugiere que no puede descartarse la posibilidad de que un prion de la EEB de pequeños rumiantes sea el agente causal de la vECJ, lo que tiene importantes implicaciones para la política de sanidad animal y salud pública. Se confirma la elevada capacidad de transmisión de la EEB caprina en comparación con la bovina. Además, el genotipo de las cabras parece desempeñar un papel clave en términos de barrera de transmisión a ratones humanizados y en cuanto a la distribución periférica en los diferentes tejidos caprinos.

Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que el desarrollo de las EET se ve modulado de diversas formas por el genotipo del gen *PRNP* del hospedador al que afectan. Así, la presencia de determinados polimorfismos en el marco de lectura abierto del gen puede dar lugar a un cambio aminoacídico en la PrP^C, pudiendo influir de esta manera en la conversión a la isoforma patógena (PrP^{Sc}), protegiendo o favoreciendo el cambio conformacional. Estos polimorfismos modulan la resistencia/susceptibilidad a

las enfermedades priónicas. Numerosas especies en las que nunca se ha observado una infección natural con EET, han sido infectadas de forma experimental (Barria et al., 2014; Cassard et al., 2014). Sin embargo, existen tres grupos de animales a los que se ha considerado históricamente como resistentes a las EET, los cánidos, los lepóridos y los équidos (Khan et al., 2010). Por ello, en el segundo estudio que forma parte de esta tesis se han identificado polimorfismos en el gen *PRNP* en la especie equina tratando de explicar su alta resistencia frente a las EET. Se han analizado 207 caballos de 20 razas diferentes. Hasta la fecha, no se ha demostrado ningún caso de enfermedad priónica en caballos con la excepción de la transmisión de un aislado de scrapie a ratones que sobreexpresaban la PrP equina (tgEq). No obstante, en dicho estudio, se comprobó que la PrP equina es muy resistente al malplegamiento, ya que no se consiguió transmitir la enfermedad en un segundo pase a ratones tgEq (Bian et al., 2017). Por ello, se sigue estudiando tanto la estabilidad estructural de la proteína PrP equina como los polimorfismos genéticos. En estudios anteriores se encontraron un total de 4 SNPs en el ORF del gen *PRNP* del caballo (c.-3A>G, c.301T>A, c.525C>A, y c.570G>A) (Kim & Jeong, 2018; Kim et al., 2020). Además, en este estudio se han encontrado otros tres nuevos polimorfismos (c.5T>G, c.237T>C c.544G>A). Uno de ellos sinónimo (237T>C) y dos no sinónimos (5T>G, 544G>A). Los SNPs c.-3A>G, c.5T>G, c.237T>C, c.301T>A y 544G>A fueron polimórficos en seis razas, observándose que la frecuencia del alelo más frecuente fue superior a 0,8. Las razas restantes eran monomórficas para el alelo más frecuente. Las frecuencias alélicas en las razas Jeju y Halla estudiadas anteriormente fueron similares para los polimorfismos c.-3A>G y c.301T>A, mientras que la raza Pura sangre fue monomórfica frente a esos SNPs (Kim & Jeong, 2018; Kim et al., 2020). Los SNPs c.525C>A y c.570G>A fueron polimórficos en la mayoría de las razas, con

frecuencias alélicas similares a las notificadas en las razas Pura sangre, Jeju y Halla (Kim & Jeong, 2018; Kim et al., 2020). Además, se identificaron trece haplotipos (Ht) en el gen *PRNP*. Utilizando el software Network, se calculó el número de pasos mutacionales que existe entre cada uno de los haplotipos. Aunque no se puede excluir la recombinación genética dentro del gen *PRNP*, el Ht2 sería el más antiguo, ya que se encuentra en un mayor número de razas, se observa con una mayor frecuencia y se encuentra en el centro de la red, por lo tanto, es el que guarda mayor relación con el resto de haplotipos. El Ht1 fue el más frecuente en las razas Pura sangre, Pura Raza Española y Westphalian. Aunque en nuestro trabajo se encontraron tres nuevos SNPs, Ht 1 fue también el más frecuente en otros trabajos en las razas Pura sangre (Kim & Jeong, 2018) y Jeju y Halla (Kim et al., 2020). La alta frecuencia del Ht1 puede deberse a efectos de consanguinidad o al efecto fundador de las razas. Posteriormente, se evaluó el impacto biológico que tendrían estos SNPs no sinónimos de la proteína prión del caballo utilizando POLYPHEN-2, PROVEAN y PANTHER. El polimorfismo V2G fue clasificado como "benigno". Este polimorfismo se encuentra en el péptido señal N-terminal del retículo endoplásmico (RE) (Kim & Jeong, 2018), por lo que al formarse la proteína madura es eliminado (Caughey et al., 1989). En el caso del polimorfismo V182I, que se localiza en la α -hélice de los residuos 175-196, PANTHER lo cataloga como "Posiblemente maligno". Esto último, se debe probablemente a que el aminoácido Valina (V) en el codón 182 está altamente conservado entre las diferentes especies, por lo que un cambio a Isoleucina (I) es detectado por el programa como un cambio posiblemente maligno. Para estimar la propensión a la formación de depósitos de proteína amiloide que podrían causar estos SNPs no sinónimos se utilizó el programa AMYCO. La proteína prión del caballo tiene un valor de 0,39 en este programa. En este estudio, se observó que los valores máximos de

propensión amiloide (0.39) están marcados por el aminoácido asparagina (N) en el codón 175. Sin embargo, este cambio no produce alteraciones en el codón 175 en relación al número de enlaces de hidrógeno, por lo que no explicaría por sí mismo la inestabilidad de la proteína. Una situación diferente ocurre con el codón 182, en el que el cambio de V a I provoca la pérdida del enlace de hidrógeno, y con ello un ligero aumento de la propensión al depósito de amiloide.

El dominio globular altamente estructurado, compuesto por tres zonas de α -hélice y dos pequeñas β -hojas antiparalelas, es una región clave de la proteína priónica del caballo (Kim & Jeong, 2018). La gran estabilidad de la estructura priónica del caballo está modulada principalmente por dos estructuras específicas denominadas bucle β 2- α 2 y puentes salinos, permitiéndole soportar cualquier condición adversa (Perez et al., 2010; Zhang, 2011). Por ello, los cambios de aminoácidos encontrados en el codón 175 están muy cerca de esta región clave. Estudios anteriores demostraron que el aminoácido S169 que se encuentra en esta región es un residuo clave en la estabilidad de la proteína priónica del caballo aumentando la estabilidad conformacional (Sanchez-Garcia & Fernandez-Funez, 2018). La mayor propensión amiloide observada en las proteínas con el aminoácido N en el codón 175 detectada mediante AMYCO podría deberse a cambios a nivel de los potenciales electrostáticos. Se ha demostrado que los cambios en las superficies cargadas de la membrana celular inducen el mal plegamiento de la PrP (Turnbaugh et al., 2012) y que el potencial electrostático también desempeña un papel clave en el proceso de agregación de la PrP (Fernández-Borges et al., 2017; Wang et al., 2016). En resumen, el gen *PRNP* del caballo presenta un bajo nivel de polimorfismos en las regiones codificantes y, además, ninguno de estos cambios implica una mayor susceptibilidad a la propensión amiloide. El cambio aminoacídico N175K

parece ser el que produce una mayor inestabilidad a nivel de la estructura. Esta inestabilidad podría ser debida a las cargas en los potenciales electrostáticos, por lo que serán necesarios más estudios en el futuro.

Recientemente, ha adquirido una gran importancia la enfermedad crónica caquetizante (ECC) en cérvidos. Hoy en día, la mayor prevalencia y alcance geográfico se encuentra en Norteamérica (Carlson et al., 2018; Miller & Williams, 2003; E. S. Williams, 2005), pero también se ha detectado en Corea del Sur (Lee et al., 2013) y se ha descrito por primera vez en Europa en el año 2016, concretamente en Noruega (Benestad et al., 2016). Desde 2005, se han realizado pruebas a más de 36.200 alces en dicho país, en las que once han resultado positivas a ECC. En Suecia, desde 2007, se han realizado pruebas de detección de ECC a más de 1.700 alces y, hasta noviembre del 2022, se han detectado cuatro casos positivos. Finlandia ha sometido a pruebas a más de 800 alces desde 2006, detectando dos casos positivos de ECC (Tranulis et al., 2021).

En el tercer estudio se investigan las características neuropatológicas de los casos naturales de ECC en alces diagnosticados en los países nórdicos utilizando la técnica de IHC para caracterizar los diferentes casos. En este estudio se encontraron similitudes, pero también diferencias en las presentaciones fenotípicas entre los alces, lo que sugiere una posible implicación de diferentes cepas de ECC. Estudios previos sugieren la presencia de diferentes cepas de ECC en Norteamérica (Angers et al., 2010). El modelo de selección conformacional (Collinge & Clarke, 2007) interpreta las cepas como mezclas o "nubes" de diferentes conformaciones de PrP^{Sc}, entre las cuales hay una predominante que determina las características fenotípicas de la enfermedad. Sin embargo, en esta "nube" pueden estar presentes isoformas minoritarias de PrP^{Sc}, a veces denominadas

"subcepas" o "cuasiespecies", que se transmiten y replican junto con el conformador dominante por debajo del umbral de detección de las técnicas de diagnóstico. Los hallazgos inmunohistoquímicos indican heterogeneidad entre los casos, pero no pueden proporcionar información sobre la posible presencia de subcepas. En los casos noruegos, para investigar el tipo de cepa o cepas de priones, los aislados de ECC se transmitieron a modelos murinos, lo que proporcionó pruebas preliminares de la existencia de varias "cepas" de priones (Bian et al., 2021; Nonno et al., 2020). En el año 2018 se describieron por primera vez los depósitos de PrP^{Sc} en alces noruegos, los cuales presentaban una edad muy avanzada y un patrón de PrP^{Sc} con depósitos intraneuronales e intragliales muy característicos, y ausencia de PrP^{Sc} en tejidos linfoides, por lo que se asoció a una forma esporádica de la ECC (Pirisinu et al., 2018). En nuestro estudio se localizaron y confirmaron estos patrones inmunohistoquímicos, pero fueron acompañados por otros muy característicos como el punteado fino por todo el neurópilo, el patrón estrellado acompañado de un patrón perineuronal en el alce noruego número 6 (No6), y un marcado patrón lineal, así como perineuronal en alce sueco número 3 (Sw3).

La IHC se realizó con un panel de cinco anticuerpos diferentes capaces de reconocer diferentes partes de la PrP. En los primeros estudios de la ECC en alces noruegos, se observó una falta de tinción con anticuerpos que se unen al extremo N-terminal de la PrP, como es el caso de los anticuerpos 12B2 y 9A2 (Pirisinu et al., 2018). Esto, indica que, esta parte de la proteína había sido degradada por proteasas endógenas. Estos hallazgos se corroboraron en todos los alces de este estudio, excepto en Sw3 y No6. En estos dos animales, la PrP^{Sc} se detectó a nivel talámico con los anticuerpos 12B2, 9A2 y P4, lo que sugiere variabilidad en los sitios de anclaje N-terminal de la proteinasa K y la posible presencia de una cepa de ECC distinta en estos animales.

El alce Sw3 fue abatido durante una cacería ordinaria y no presentaba signos clínicos graves de ECC. Este animal presentaba la mayor cantidad de PrP^{Sc}, según la tinción inmunohistoquímica. Por el contrario, el alce Sw2 mostraba una de las puntuaciones más bajas en la tinción inmunohistoquímica de PrP^{Sc}, pero en cambio había mostrado marcados cambios de comportamiento y estaba demacrado. Por lo tanto, en este estudio no se encontró una correlación clara entre la gravedad de los signos clínicos y los niveles de depósitos de PrP^{Sc}. Además, se han observado casos subclínicos de infección por priones tanto en animales como en humanos (Hill & Collinge, 2003).

En resumen, en este trabajo se ha ampliado el conocimiento acerca de la multitud de presentaciones que puede mostrar la ECC en alces. En el estudio también se corrobora la falta de PrP^{Sc} en tejidos linfoides en todos los animales, lo que concuerda con la presentación de formas atípicas de EET en bovinos y pequeños rumiantes. No obstante, es preciso indicar que se están llevando a cabo varios estudios de transmisión en modelos murinos, para investigar los diferentes tipos de cepas de ECC encontradas en los alces nórdicos.

Otro de los grandes retos a los que se enfrenta la investigación en las enfermedades priónicas es que, actualmente, estas enfermedades se diagnostican cuando los signos clínicos son evidentes (Hermann et al., 2021). Es decir, al diagnosticarse la enfermedad el daño neuronal ya es muy manifiesto, por lo que el beneficio de los posibles tratamientos es muy limitado. Por ello en el cuarto estudio, se ha evaluado la posibilidad del uso de la polisomnografía como herramienta diagnóstica y, además, se han determinado las posibles alteraciones del sueño que pueden sufrir las ovejas infectadas por scrapie. Teniendo en cuenta que la PrP^c interviene en varios

procesos fisiológicos, existen varios modelos de disfunción de PrP^c, en los que se producen marcadas alteraciones de los ritmos circadianos (Tobler et al., 1996), lo que sugiere que la PrP^c desempeña un papel clave en uno de los procesos más esenciales para la vida: el sueño/vigilia. Este estudio es el primer trabajo que realiza una comparación detallada de los patrones de sueño-vigilia y la distribución de las frecuencias de los encefalogramas (EEG) en ovejas sanas e infectadas por scrapie. Las ovejas tienen una serie de ventajas sobre otras especies para estudiar la neurobiología del sueño ya que presentan una anatomía cerebral similar a la humana, con cortezas cerebrales con circunvoluciones, son diurnas y su estructura del sueño es muy similar a la de los humanos (Toth & Bhargava, 2013). Además, su esperanza de vida es especialmente útil para estudiar enfermedades de aparición tardía, como las EET. Los resultados de la polisomnografía muestran que las ovejas duermen un número de horas muy reducido, ya que las ovejas control pasaron el 73% de la noche despiertas. Las ovejas clínicas pasaron más tiempo en vigilia que las ovejas preclínicas y mucho más tiempo que las ovejas sanas, lo que sugiere que su respuesta a la presión del sueño es anormal. Cada vez es más evidente que las enfermedades neurodegenerativas crónicas suelen ir acompañadas de disfunción del sueño y pueden aparecer incluso varios años antes de la presentación de los síntomas principales (Ju et al., 2014; Schrempf et al., 2014). Un estudio realizado en 2016 en pacientes con enfermedad de Creutzfeldt – Jakob familiar (ECJf) demostró que todos los casos analizados mostraron anomalías del sueño, incluido un aumento de los periodos de vigilia nocturna (Givaty et al., 2016). Al evaluar el número de fragmentaciones del sueño, se observó que las ovejas clínicas presentaban un número significativamente mayor de las mismas durante la noche en comparación con las ovejas control y preclínicas. Asimismo se ha demostrado que los

monos rhesus infectados con kuru muestran fragmentaciones del sueño durante la noche (Bert et al., 1978) y también se ha observado que los ratones inoculados con priones murinos muestran fragmentación del sueño al poco tiempo de la inoculación (Steele et al., 2007). Las ovejas con scrapie clínico y preclínico mostraron alteraciones del sueño NREM y REM en comparación con las ovejas control. En las ovejas clínicas, se observó una pérdida total del sueño REM y una disminución significativa en el caso de las ovejas preclínicas. En la enfermedad de Parkinson, la alteración del sueño REM se observó incluso décadas antes del desarrollo de la sinucleinopatía (Postuma et al., 2013). En las enfermedades priónicas, se describe una pérdida total del sueño REM en monos rhesus infectados con kuru (Bert et al., 1978), y en pacientes afectados por ECJf, que presentaron pérdida y disminución del sueño REM (Givaty et al., 2016). Recientemente, en el año 2022, se observó un paciente con ECJ que presentaba graves alteraciones del sueño REM cinco años antes de la aparición de la enfermedad (El Sammak et al., 2022). El análisis del EEG mostró una menor cantidad de frecuencias delta en las ovejas clínicas respecto a las ovejas control, lo que sugiere que el sueño NREM de las ovejas clínicas es menos profundo que el de las ovejas control. Similares resultados se obtuvieron al infectar monos con kuru en los que se observó que el sueño NREM se hacía cada vez más ligero (Bert et al., 1978). También en la Enfermedad de Huntington se ha observado que la alteración de las frecuencias delta es una característica temprana de la enfermedad (Burgold et al., 2019). El sueño superficial sin períodos sólidos de sueño de ondas lentas también se ha observado en pacientes con ECJf lo que causa un sueño anormal y perturbado (Givaty et al., 2016). En pacientes afectados por la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Sheinker, no se han descrito alteraciones del sueño (Provini et al., 2009), lo que sugiere que las alteraciones del sueño son específicas

de algunas cepas priónicas. Por todo lo expuesto, es evidente que todavía es necesario realizar más trabajos de investigación para aclarar el papel de la proteína priónica patológica en la función normal del sueño.

En su conjunto los resultados obtenidos de esta tesis corroboran la importancia del estudio de los factores implicados en la transmisión y especialmente en la susceptibilidad genética de la que el responsable el gen *PRNP*. En la actualidad, las enfermedades priónicas se enfrentan todavía a grandes retos, y uno de ellos es sin ninguna duda la posibilidad de realizar un diagnóstico lo más precoz posible para poder establecer tratamientos que puedan aumentar la esperanza de vida del individuo afectado.

Conclusiones/Conclusions

Conclusiones

1. La Encefalopatía espongiforme bovina de origen caprino muestra una mayor capacidad de transmisión en modelos de ratones transgénicos humanos que la Encefalopatía espongiforme bovina de origen bovino ya que sólo los encéfalos de los ratones inoculados con tejidos de cabras infectadas con Encefalopatía espongiforme bovina de origen caprino mostraron amplificación de priones por PMCA.
2. El polimorfismo (Q222K) parece desempeñar un papel clave en barrera de transmisión de la Encefalopatía espongiforme bovina de origen caprino a ratones humanizados y en la distribución periférica de los priones en diferentes tejidos caprinos. Por consiguiente, la continuación de los programas de cría del alelo K222 será de gran importancia.
3. El gen *PRNP* del caballo presenta una baja variabilidad genética en las regiones codificantes, con la presencia de siete polimorfismos de un solo nucleótido. Esto indica que el genoma de los caballos está relativamente bien conservado en comparación con otras especies.
4. El polimorfismo N175K de la proteína priónica equina podría tener implicaciones en la estabilidad estructural de la proteína y su propensión a la formación de agregados amiloides. Estos cambios podrían influir en la susceptibilidad de los caballos a enfermedades priónicas.
5. La heterogeneidad fenotípica de los diferentes casos de Enfermedad crónica caquetizante entre los alces europeos, sugiere la posible implicación de diferentes cepas independientemente del país de origen de los animales.
6. Las características neuropatológicas observadas en los alces europeos afectados por enfermedad crónica caquetizante, junto con su avanzada edad y la ausencia

Conclusiones

de PrP^{Sc} detectable en los tejidos linfoides, sugieren una nueva forma de esta enfermedad de origen esporádico.

7. Las ovejas clínicas y preclínicas afectadas por scrapie presentan alteraciones marcadas en sus patrones de sueño-vigilia en comparación con las ovejas control. Pasan más tiempo despiertas durante el periodo de descanso y experimentan una mayor fragmentación del sueño.
8. Tanto las ovejas clínicas de scrapie como las preclínicas muestran cambios en el sueño de movimientos oculares rápidos y el sueño de no movimientos oculares rápidos en comparación con las ovejas control, por lo que se demuestra que las enfermedades priónicas pueden afectar a la calidad y la distribución del sueño en diferentes etapas de la enfermedad.
9. La alteración de las frecuencias de ondas delta durante el sueño de no movimientos oculares rápidos en las ovejas clínicas de scrapie indica que la enfermedad afecta a la profundidad del sueño y puede tener implicaciones en la calidad y el descanso general de los animales afectados.
10. Todos estos resultados sugieren que la polisomnografía puede ser una herramienta útil para diagnosticar trastornos del sueño en enfermedades priónicas y puede tener un gran potencial para la identificación temprana de estos trastornos.

Conclusions

- 1- Caprine bovine spongiform encephalopathy shows a higher transmission capacity in human transgenic mouse models than bovine spongiform encephalopathy of bovine origin as only the brains of mice inoculated with tissues from caprine bovine spongiform encephalopathy-infected goats showed amplification of prions by PMCA.
- 2- The polymorphism (Q222K) appears to play a key role in the transmission barrier of caprine bovine spongiform encephalopathy to humanised mice and in the peripheral distribution of prions in different goat tissues. Therefore, the continuation of breeding programmes for the K222 allele will be of great importance.
- 3- The horse *PRNP* gene has low genetic variability in coding regions, with the presence of seven single nucleotide polymorphisms. This indicates that the horse genome is relatively well conserved compared to other species.
- 4- The N175K polymorphism of the equine prion protein could have implications for the structural stability of the protein and its propensity to form amyloid aggregates. These changes could influence the susceptibility of horses to prion diseases.
- 5- The phenotypic heterogeneity of the different cases of Chronic wasting disease among European moose suggests the possible involvement of different strains regardless of the country of origin of the animals.
- 6- The neuropathological features observed in European moose affected by Chronic Wasting Disease, together with their advanced age and the absence of

Conclusions

detectable PrP^{Sc} in lymphoid tissues, suggest a new form of this disease of sporadic origin.

- 7- Clinical and preclinical sheep affected by scrapie show marked alterations in their sleep-wake patterns compared to control sheep. They spend more time awake during the rest period and experience greater sleep fragmentation.
- 8- Both clinical and preclinical sheep with scrapie show changes in Rapid Eye Movement sleep and Non-Rapid Eye Movement sleep compared to control sheep, demonstrating that prion diseases can affect the quality and distribution of sleep at different stages of the disease.
- 9- The alteration of delta waves frequencies during Non-Rapid Eye Movement sleep in clinical scrapie sheep indicates that the disease affects the depth of sleep and may have implications for the overall quality and rest of affected animals.
- 10- Polysomnography can be a useful tool for diagnosing sleep disorders in prion diseases and may have great potential for early identification of these disorders

Resumen/Abstract

El prion, agente causal de las EET, es una proteína anómala (PrP^{Sc}) que se forma mediante la conversión conformacional de una glicoproteína de superficie celular (PrP^C) presente en el hospedador de forma natural. Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) tuvieron gran importancia en los años 80 en el Reino Unido con la asociación de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en el ganado bovino y la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en el ser humano debido al consumo de carne de vacuno contaminada con la proteína priónica. La cabra es la única especie de pequeños rumiantes en la que se han diagnosticado dos casos naturales de encefalopatía espongiforme bovina (EEB), lo que sugiere un riesgo muy elevado para la salud humana que podría reducirse mediante la selección genética de animales resistentes. La presencia de lisina en el codón 222 parece tener un efecto protector tras la infección oral y prolonga el periodo de incubación contra el scrapie y la EEB bovina, pero no tiene un efecto potente contra la EEB caprina tras la exposición intracerebral. Debido a esto, en el **estudio número 1** de esta tesis, se presenta un artículo en el que se evalúa la infectividad de tejidos y fluidos caprinos (con diferentes genotipos en el codón 222) que resultaron negativos por técnicas de diagnóstico convencionales, inoculados intracerebralmente con EEB caprina y EEB bovina mediante bioensayo en ratón. Así se ha podido determinar el riesgo de exposición del ser humano a la EEB a través del consumo de productos cárnicos y lácteos caprinos potencialmente contaminados.

Los tejidos y fluidos elegidos fueron el obex, el músculo semitendinoso, músculo tríceps braquial, hígado, sangre entera, leucocitos, leche en crema, suero de la leche y células de la leche. Para evaluar la susceptibilidad humana, se inoculó una línea de ratones transgénicos que expresaban el alelo metionina (M) de la PrP humana en el codón 129 (Tg340). Los ratones inoculados con obex caprinos resultaron positivos por

inmunohistoquímica (IHC) y western blot (WB), el resto de ratones inoculados con los tejidos y fluidos que eran negativos por técnicas convencionales resultaron también negativos. Los ratones inoculados con aislados de EEB bovina y caprina derivados del obex mostraron características neuropatológicas similares a las obtenidas tras la transmisión de la vECJ en ratones que expresaban la PrP humana. Los inóculos de obex de EEB caprina muestran una mayor capacidad de transmisión a ratones Tg340 que los inóculos de obex de EEB bovina. En relación al genotipo, los inóculos de obex de EEB caprina procedentes de cabras homocigotas glutamina (G) en el codón 222 muestran mayores tasas de ataque en ratones Tg340. Mediante la técnica de la Amplificación cíclica de la proteína mal plegada (PMCA) sólo unos pocos ratones inoculados con tejidos negativos de cabras infectadas con EEB caprina mostraron amplificación. Éstos fueron el músculo semitendinoso, el músculo tríceps braquial, el hígado y la sangre total. En cuanto al genotipo de las cabras, se ha observado que la presencia de glutamina en el codón 222 implica una gran distribución periférica del prion, ya que se detecta amplificación en ratones inoculados con músculo, hígado y sangre total. Por lo tanto, la continuación de los programas de selección genética para el alelo K222 en cabras es de gran importancia.

Otro de los principales focos de las investigaciones actuales es la resistencia a las enfermedades priónicas ya que existen tres grupos de animales a los que se les ha considerado históricamente como resistentes a las EET, se trata de los cánidos, los lepóridos y los équidos. La mayoría de las enfermedades priónicas y, por tanto, su susceptibilidad y patogénesis, están moduladas principalmente por el gen *PRNP*. Las mutaciones en el gen *PRNP* pueden alterar la secuencia de aminoácidos de la PrP^C, dando lugar a un cambio en la eficacia de la transmisión dependiendo del lugar donde

se produzca. Por ello, en el **estudio número 2** se han identificado polimorfismos en el gen *PRNP* en la especie equina tratando de explicar su alta resistencia frente a las EET. Se han analizado 207 caballos de 20 razas diferentes, descubriendo 3 nuevos polimorfismos nuevos hasta la fecha, uno sinónimo (237T>C) y dos no sinónimos (5T>G, 544G>A). Utilizando programas informáticos como PolyPhen-2, PROVEAN y PANTHER se ha determinado el impacto que estos nuevos polimorfismos tendrían sobre la proteína priónica del caballo. Además, se ha medido la propensión a la agregación amiloide utilizando el software AMYCO y analizado la falta de puentes de hidrógeno que supondrían estos cambios junto con sus potenciales electrostáticos utilizando el software Swiss-PdbViewer mostrando que una mayor propensión amiloide podría deberse a cambios a nivel de potenciales electrostáticos.

Recientemente en el año 2016, la enfermedad crónica caquetizante (ECC) adquirió gran importancia a nivel europeo debido a la primera detección de la enfermedad, en un reno salvaje (*Rangifer tarandus*) en Noruega. La posterior vigilancia intensiva iniciada en cérvidos, dio lugar a la detección de ECC en alces (*Alces alces*), con 11 casos en Noruega, 3 en Finlandia y 4 en Suecia. En el **estudio número 3** se han caracterizado mediante inmunohistoquímica (IHC) 7 alces noruegos, 4 alces suecos y 2 finlandeses aplicando un panel de anticuerpos monoclonales (mAbs). Estos casos difieren considerablemente de los casos norteamericanos de ECC, ya que se produjeron en animales de más de 10 años, y la proteína priónica patológica (PrP^{Sc}) era detectable en el cerebro, pero no en los tejidos linfoides. Los distintos tipos de depósitos de PrP^{Sc} encontrados entre los alces demuestran fuertes variaciones entre los casos, lo que apoya la teoría de que estos casos podrían ser portadores de múltiples cepas de caquexia crónica.

Uno de los principales objetivos de los estudios sobre las EET es intentar establecer un diagnóstico precoz, ya que los signos clínicos no aparecen hasta que el daño en el sistema nervioso central está muy avanzado, lo que impide cualquier abordaje terapéutico. El **estudio número 4** es la primera descripción de las alteraciones del sueño causadas por el scrapie en ovinos. Las alteraciones del sueño en ovejas afectadas por scrapie preclínico y clínico se evaluaron mediante polisomnografía en comparación con controles sanos. La polisomnografía se trata de una técnica innovadora y no invasiva que permite investigar en profundidad el ciclo sueño/vigilia. Como resultados iniciales, se ha observado una disminución del tiempo total de sueño a medida que avanza la enfermedad. También se muestra un aumento de la fragmentación del sueño en los animales enfermos en comparación con los animales preclínicos y de control. Además, las ovejas con scrapie clínico muestran una pérdida total de sueño REM y alteraciones en el sueño NREM en comparación con las ovejas de control, demostrando un sueño más superficial.

Estos cuatro estudios han conseguido cumplir los objetivos propuestos al inicio de la tesis, incrementando el conocimiento tanto de la transmisión, patogenia, factores genéticos y diagnóstico en las diferentes encefalopatías espongiformes transmisibles.

Abstract

The prion, the causative agent of TSEs, is an abnormal protein (PrP^{Sc}) formed by conformational conversion of a cell surface glycoprotein (PrP^C) naturally present in the host. Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) came to prominence in the 1980s in the UK with the association of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in cattle and variant Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD) in humans due to the consumption of beef contaminated with the prion protein. The goat is the only small ruminant species in which two natural cases of bovine spongiform encephalopathy (BSE) have been diagnosed, suggesting a very high risk to human health that could be reduced by genetic selection of resistant animals. The presence of lysine at codon 222 appears to have a protective effect after oral infection and prolongs the incubation period against scrapie and bovine BSE, but did not have a strong effect against caprine BSE after intracerebral exposure. Therefore, **in study number 1** of this thesis, a study is presented in which the infectivity of goat tissues and fluids (with different genotypes at codon 222) that were negative by conventional diagnostic techniques, inoculated intracerebrally with caprine BSE and bovine BSE by mouse bioassay, is evaluated. The risk of human exposure to BSE through the consumption of potentially contaminated goat meat and dairy products has thus been determined.

The tissues and fluids chosen were obex, semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver, whole blood, leukocytes, cream milk, milk serum and milk cells. To assess human susceptibility, a line of transgenic mice expressing the methionine (M) allele of human PrP at codon 129 (Tg340) was inoculated. Mice inoculated with goat obex were positive by immunohistochemistry (IHC) and western blot (WB), the remaining mice inoculated with tissues and fluids that were negative by conventional techniques were also negative. Mice inoculated with obex-derived bovine and caprine BSE isolates

Abstract

showed neuropathological features similar to those obtained after vCJD transmission in mice expressing human PrP. Caprine BSE obex inocula show a higher transmission capacity to Tg340 mice than bovine BSE obex inocula. In relation to genotype, goat BSE obex inocula from goats homozygous for glutamine (G) at codon 222 show higher attack rates in Tg340 mice. By protein misfolding cyclic amplification (PMCA) only a few mice inoculated with negative tissues from goats infected with goat BSE showed amplification. These were semitendinosus muscle, triceps brachii muscle, liver and whole blood. As for the goat genotype, it was observed that the presence of glutamine at codon 222 implied a large peripheral distribution of the prion, as amplification was detected in mice inoculated with muscle, liver and whole blood. Therefore, the continuation of genetic selection programmes for the K222 allele in goats is of great importance.

Another major focus of current research is resistance to prion diseases as there are three groups of animals that have historically been considered resistant to TSEs, namely canids, leporids and equids. Most prion diseases, and therefore their susceptibility and pathogenesis, are mainly modulated by the *PRNP* gene. Mutations in the *PRNP* gene can alter the amino acid sequence of PrP^C, resulting in a change in transmission efficiency depending on the site of transmission. Therefore, **in study number 2**, polymorphisms in the PRNP gene have been identified in the equine species in an attempt to explain their high resistance to TSEs. A total of 207 horses from 20 different breeds have been analysed, discovering 3 new polymorphisms, one synonymous (237T>C) and two non-synonymous (5T>G, 544G>A). Using software such as PolyPhen-2, PROVEAN and PANTHER, the impact of these new polymorphisms on the horse prion protein has been determined. In addition, the propensity for amyloid

Abstract

aggregation has been measured using AMYCO software and the lack of hydrogen bridges that these changes would entail together with their electrostatic potentials have been analysed using Swiss-PdbViewer software showing that an increased amyloid propensity could be due to changes at the level of electrostatic potentials.

Recently in 2016, chronic wasting disease (CWD) gained prominence at European level due to the first detection of the disease in a wild reindeer (*Rangifer tarandus*) in Norway. Subsequent intensive surveillance in cervids led to the detection of CCHD in moose (*Alces alces*), with 11 cases in Norway, 3 in Finland and 4 in Sweden. **In study number 3**, 7 Norwegian, 4 Swedish and 2 Finnish moose have been characterised by immunohistochemistry (IHC) using a panel of monoclonal antibodies (mAbs). These cases differ considerably from the North American cases of CCD, as they occurred in animals older than 10 years, and the pathological prion protein (PrP^{Sc}) was detectable in the brain, but not in lymphoid tissues. The different types of PrP^{Sc} deposits found among the moose demonstrate strong variations between cases, supporting the theory that these cases may carry multiple strains of CWD.

One of the main objectives of TSE studies is to try to establish an early diagnosis, as clinical signs do not appear until the damage to the central nervous system is very advanced, which prevents any therapeutic approach. **Study number 4** is the first description of sleep disturbance caused by scrapie in sheep. Sleep disturbances in sheep affected by preclinical and clinical scrapie were assessed by polysomnography compared to healthy controls. Polysomnography is an innovative and non-invasive tool to investigate the sleep/wake cycle in depth. A decrease in total sleep time is observed as the disease progresses. It also shows an increase in sleep fragmentation in diseased

Abstract

animals compared to preclinical and control animals. In addition, sheep with clinical scrapie show a total loss of REM sleep and alterations in NREM sleep compared to control sheep, demonstrating more shallow sleep.

These four studies have achieved the objectives proposed at the beginning of the thesis, increasing the knowledge of transmission, pathogenesis, genetic factors and diagnosis in the different transmissible spongiform encephalopathies.

Anexos

Anexo 1: Protocolo de procesamiento de tejidos y elaboración de cortes histológicos

- **Fijación y tallado:**

1. Introducir la muestra en formol tamponado al 10% en volumen suficiente para que ésta flote libremente en el líquido fijador durante 24 horas.
2. Tallar en una cabina de bioseguridad secciones de aproximadamente 2-3mm de grosor.
3. Introducir las secciones en cassettes y dejarlos fijar en formol tamponado al 10% durante 24 horas.

- **Procesado del tejido:**

Deshidratar e incluir el tejido en parafina. A continuación, se muestra el protocolo de rutina en el inclusor automático al vacío TP1050:

Reactivo	Tiempo	Ambiente
Formol 10%	10 min	Ambiente
Alcohol 70º	2 h	Ambiente
Alcohol 70º	2 h	Ambiente
Alcohol 96º	1 h	Ambiente
Alcohol 96º	1 h	Ambiente
Alcohol 100º	1 h	Ambiente
Alcohol 100º	2 h	Ambiente
Alcohol 100º	2 h	Ambiente
Xileno	1 ½ h	Ambiente
Xileno	1 ½ h	Ambiente
Parafina	1 ½ h	56-60ºC
Parafina	1 ½ h	56-60ºC
Parafina	1 ½ h	56-60ºC

- **Montaje de bloques en la consola de parafina:**

1. Dejar los bloques en parafina líquida durante un mínimo de 30'.
2. Abrir los cassettes y colocar el tejido en un molde lleno de parafina líquida.
3. Dejar solidificar la parafina a temperatura ambiente sobre una placa fría, formándose así un bloque sólido con el tejido en su interior.
4. Desbastar el bloque de parafina mediante cortes de 15um hasta que todo el tejido esté representado en la superficie de corte.

Anexos

5. Enfriar los bloques durante aproximadamente 2 horas (4°C) para facilitar el corte posterior.
6. Realizar corte de 4 μm .
7. Depositar las secciones en un baño termostático a aproximadamente 45°C, de modo que los cortes floten y se estiren, evitando la presencia de arrugas en los mismos.
8. Recoger las secciones con portaobjetos tratados con xilol (starfrost).
9. Secar los portaobjetos a 56°C durante 30' o a 37°C durante 12 horas.

Anexo 2: Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina

Cortar las secciones (3-5 μm) y recogerlas sobre portaobjetos tratados (starfrost).
Secar las secciones toda la noche a 56^o C.

- **Desparafinado:**

Se realizan una serie de inmersiones en los siguientes reactivos:

1. Xilol: 4'
2. Xilol: 4'
3. Alcohol 100^o: 4'
4. Alcohol 100^o: 4'
5. Alcohol 96^o: 1'
6. Alcohol 70^o: 1'
7. Agua corriente: 1'

- **Tinción:**

Se realizan una serie de inmersiones en los siguientes reactivos:

1. Hematoxilina: 5'
2. Agua corriente: 1'
3. Alcohol ácido: 2'
4. Eosina: 2'

- **Deshidratación y montaje**

1. Alcohol 100^o: 1'
2. Alcohol 100^o: 1'
3. Xilol: 1'
4. Xilol: 5'
5. Montar en Dibutylphtalate Poliestireno Xileno (DPX)

Anexo 3. Técnica inmunohistoquímica para la detección de PrP^{Sc} en encéfalo de ratón.

Cortar las secciones (3-5 µm) y recogerlas sobre portaobjetos tratados (starfrost).
Secar las secciones toda la noche a 56º C.

- **Desparafinado:**
 1. Xilol: 5´
 2. Xilol: 5´
 3. Alcohol 100º: 5´
 4. Alcohol 100º: 5´
 5. Alcohol 96º: 3´
 6. Alcohol 70º: 3´

- **Desenmascarado de epítomos:**
 1. Inmersión de las secciones en ácido fórmico (98%): 10´
 2. Lavar 10´ en agua corriente.
 3. Digestión con proteinasa K: 4g/ml, 15´ a 37ºC en tampón precalentado.
 4. Autoclavado hidratado con tampón citrato: 10´ a 96ºC

- **Inmunodetección**
 1. Cubrir las muestras con solución de peroxidasa (kit Envision-DAB, DAKO) durante 5´ para bloquear la peroxidasa endógena.
 2. Incubar las muestras con el anticuerpo primario anti-PrP durante 1 h (3F4 1:1000) o toda la noche en refrigeración (R486 1:8000)
 3. Lavar con Wash buffer (Tween 20 al 0.1 % en H₂O) 5´ x3 veces.
 4. Incubar con el polímero marcado Envision "goat anti-mouse" (kit Envision DAB, DAKO) durante 30´
 5. Lavar con Wash buffer 5´ x3 veces.
 6. Incubar con el cromógeno DAB plus (kit Envision DAB, DAKO) 5´
 7. Lavar con H₂O 5´ x3 veces.
 8. Teñir las muestras con hematoxilina durante 5´
 9. Lavar con agua destilada

- **Deshidratación y montaje**
 1. Alcohol 70º: inmersión (x 3), Alcohol 96º: inmersión (x 3), Alcohol 100º: inmersión (x3), Alcohol 100º: inmersión (x 3), Xilol: inmersión (x 3), Xilol: inmersión 5´
 2. Montar en DPX

Anexo 4. Protocolo de Western Blot para la detección de PrP^{res} en encéfalo de ratón

Preparar un homogeneizado de encéfalo al 10% (peso/volumen) en PBS. Para ello se triturará la muestra utilizando tubos de 1,5 ml con microcuentas de cerámica (Bio-Rad) empleando el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).

- Digestión

1. Mezclar 100 ul del homogeneizado al 10% y mezclar con 100 ul de oveja negativa (preparada al 10%) para obtener un volumen final de 200 ul
2. Preparar Buffer de digestión: 1 ml de sarkosi al 10%-SDS al 20% + 4 ul de PK.
3. Añadir un volumen (200 ul) de PK y digerir durante 15min a 37°C
4. Añadir 200 ul del reactivo 2-Butanol
5. Mezclar las muestras por inversión varias veces
6. Centrifugar los tubos durante 7 minutos a 15000g a 20°C
7. Desechar el sobrenadante dándoles la vuelta sobre papel absorbente durante 5 minutos
8. Añadir 50 ul de buffer de carga 1X (con SDS y DTT)
9. Dejar que las muestras se rehidraten a temperatura ambiente durante 5 minutos
10. Resuspender con una pipeta o vórtex
11. Incubar 5 minutos a 100°C en bloque térmico
12. Centrifugar 15 minutos a 5000g a 20°C

- Electroforesis

1. Preparar tampón de migración (50 ml tampón MES + 950 ml H₂O destilada)
2. Cargar 20-25 µl en los pocillos del gel (Criterion XT 12% Bis-Tris Precast Gel)
3. Realizar la electroforesis a 80 V/30' + 150 V/90'

- Transferencia

1. Preparar tampón de transferencia (1875 ml H₂O d + 250 ml Tris CAPS 10 X + 375 ml etanol puro)
2. Activar la membrana (Inmuno-Blot PVDF Membrane) con:
 - a. Etanol puro: 15''
 - b. H₂O d 5' (en agitación lenta)
 - c. Tampón de transferencia: 5'
3. Sacar el gel con cuidado manejándolo con una espátula húmeda
4. Realizar la transferencia a 150V durante 90'

- Fijación de proteínas

1. Poner la membrana en agitación suave en los siguientes reactivos:
 - a. PBS 1x: 5-10''
 - b. Etanol puro: 5-10''
 - c. H₂O d: 5'

- Inmunodetección

1. Bloquear la membrana en una solución de leche desnatada al 5% durante 60'
2. Lavar con PBST 3x5'
3. Incubar la membrana con el anticuerpo primario anti-PrP durante 1 h (Sha31, 1:8000; 12B2 1:10000) diluido en PBST
4. Lavar con PBST 3x5'
5. Incubar con anticuerpo secundario conjugado con estreptavidina (1:5000) diluido en PBST durante 1h

Anexos

6. Lavar con PBST 1x10' y 3x5'
- **Revelado**
 1. Incubar la membrana con el revelador ECL Select en oscuridad durante 5 minutos a oscuras
 2. Hacer foto con el analizador de imagen

Anexo 5. Protocolo de Dot blot para la detección de PrP^{Sc}

- Digestión

1. Añadir 2 µl de SDS al 3% a 18 µl del homogeneizado
2. Diluir la PK (18,6 mg/ml) en PBS 1x y añadir 5 µl a la muestra
3. Incubar a 37°C durante 1 h
4. Añadir 25 µl de Laemmli Sample Buffer 2x (Bio-rad) para detener la digestión
5. Desnaturalizar a 95°C durante 5´

- Transferencia

1. Añadir 25 µl de SDS al 1% a 5 µl de la muestra desnaturalizada
2. Inmersión del papel Whatman y de la membrana de nitrocelulosa (0,2 µm) en buffer de
3. transferencia
4. Depositar suavemente 30 µl de la muestra sobre la membrana
5. Esperar 20-30´´
6. Limpiar los pocillos añadiendo 100 µl de SDS al 1% (2 veces) y esperar 1´
7. Limpiar la membrana con PBST (10´´ x 2)

- Inmunodetección

6. Bloqueo de la membrana en 50 ml de PBST 0,1% + BSA 2% durante 30´ en agitación lenta
7. Incubación con 30 ml del anticuerpo primario Sha31, diluido 1:8000 en PBST + BSA,
8. durante 30´ en agitación lenta
9. Lavado con PBST 1 x 5´ y 1 x 10´ en agitación rápida
10. Incubación con 40 ml del anticuerpo secundario HRP anti-mouse (Bio-rad), diluido
11. 1:5000 en PBST + BSA durante 20´ en agitación lenta
12. 5. Lavado con PBST 1 x 5´ y 2 x 10´ en agitación rápida
13. 6. Sumergir la membrana en H₂O para eliminar los restos de PBST

- Revelar la membrana con 250 µl de luminol y 250 µl de peróxido (Pierce) y visualizarla con Versa Doc System (Bio-rad)

Anexo 6. Protocolo de extracción de ADN a partir de sangre

Para realizar la extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) se utilizará el kit de QIAGEN® (QIAamp 96 Blood Kit), destinado a la extracción a partir de sangre.

- Lisis celular

1. Añadir 200 µl de la sangre a un eppendorf de 2 ml.
2. Añadir 200 µl de tampón AL y 50 µl de pK, y homogeneizar durante 15''.
3. Incubar a 56°C durante 10 minutos en el termoblock.

Una vez se ha realizado la lisis celular, se añade 200 µl de etanol 100% y se mezcla durante 15''.

- Recuperación del ADN precipitado en la columna y lavados

1. Transferir toda la muestra a una columna "DNeasy spin" que se encuentra en un tubo colector de 2 ml.
2. Centrifugar a 6.000g durante 1 minuto. Eliminar lo recogido en el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
3. Añadir 500 µl de buffer de lavado AW1 y centrifugar a 6.000g durante 1 minuto. Eliminar lo recogido en el tubo colector y colocar la columna en uno nuevo.
4. Añadir 500 µl de buffer de lavado AW2 y centrifugar a 15.000g durante 3 minutos. Eliminar lo recogido en el tubo colector y colocar la columna en un eppendorf esterilizado.

- Recuperación del ADN

1. Añadir 200 µl de buffer AE e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 6.000g durante 1 minuto.
3. Recoger el filtrado y volver a ponerlo en la columna. Centrifugar a 6.000g 1 minuto.
4. Recuperar el filtrado y congelar.

Anexo 7. Protocolo de amplificación y secuenciación de la región ORF del gen *PRNP*

Para llevar a cabo la amplificación del ORF se utilizará la técnica de la PCR basada en estudios anteriores (Kim et al.,2018), con una serie de modificaciones que se detallan a continuación.

- **Preparación de la mezcla para la reacción de PCR**

Se utilizarán los reactivos del kit de PCR de QIAGEN®. La cantidad de cada reactivo se multiplicará por el número de muestras a amplificar, añadiendo a este número dos más para los controles negativos.

Reactivo	Cantidad	Concentración
Tampón 10x	10µl	10x
QSolution	10 µl	5x
Cebador FWD	2,5 µl	1/20
Cebador REV	2,5 µl	1/20
dNTPs (A,C,G,T)	1 µl	10mM
Taq DNA polimerasa	0,6 µl	5U.l/µl
H2O ultrapura	26,4 µl	18M

Los Primers utilizados son: PRNP-F: GGACACTGACACCCTCTTCATTTT

PRNP-R: AAGGCCATCCTCATCCCACT

A continuación, se dispensan en cada pocillo de la placa del kit 2 µl de solución de ADN y 48 µl de mezcla, disponiéndose así de un volumen total de PCR de 50 µl. Se dispensará también la muestra en dos pocillos sin ADN que servirán como controles negativos.

- **Reacción de PCR**

Se sella la placa para evitar la evaporación de las muestras y se introduce en el Termociclador, el cual se programará con los siguientes ciclos:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
94°C	2 minutos	1
94°C	45 segundos	35x
60°C	45 segundos	
72°C	90 segundos	
72°C	10 minutos	1
4°C	O.N.	1

- **Electroforesis en gel de agarosa**

Una vez se complete el programa de PCR, se llevará a cabo una electroforesis para comprobar que se ha amplificado el gen correctamente. En primer lugar, se preparará el gel siguiendo los siguientes pasos:

1. Mezclar en un matraz de 1 g de agarosa y 50 ml de TBE 1x
2. Calentar la mezcla hasta ebullición y añadir 5 µl de Gel Green® Nucleic Acid Gel Stain (Biotium®)
3. Verter en la cubeta de electroforesis, colocar el peine y dejar enfriar

A continuación, se carga el gel y se realizará la electroforesis:

1. Cargar 8 µl de producto amplificado y 2 µl de azul de bromofenol.
2. Cargar 1 µl de marcador molecular de 1 Kb en el extremo del gel.
3. Realizar la electroforesis a 100V durante 10 minutos.

Una vez terminada la PCR, se comprobará la correcta amplificación del gen *PRNP* mediante la visualización del gel con un analizador de imagen con luz ultravioleta, utilizando el software Quantity One®.

- **Purificación del ADN**

1. Añadir los productos de PCR (42 µl) a los pocillos de una placa de filtros Millipore®.
2. Acoplar la placa de filtros a la bomba de vacío "vacuum minifold" de 24 pulgadas Hg de presión durante 3 minutos.
3. Añadir 40 µl de agua pura, tapar la placa y colocar en agitación durante 45 minutos.

Una vez el ADN amplificado esté purificado, se enviará a secuenciar junto con los primers correspondientes al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional, perteneciente al Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

Anexo 8. Preparación de inóculos para bioensayo en ratón (óbex, músculos e hígado).

1. Homogenización de tejidos caprinos (Óbex, músculo bíceps braquial, músculo semitendinoso, hígado) en suero salino fisiológico al 10% (0,1 g por cada ml de suero), empleando tubos de 1,5 ml con microcuentas de cerámicas y el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).
2. Filtración del homogenizado a través de una gasa estéril empleando una jeringuilla.
3. Añadir 1 µl del antibiótico ESPES Inyect (CASIER) por cada 2 ml de inóculo.
4. Realización de cultivo de los inóculos en placas de agar sangre para asegurar su esterilidad. Incubar a 37°C durante una noche.
5. Alicuotar inóculos y almacenar en congelación a -80°C.

Anexo 9. Preparación de inóculos de sangre para bioensayo en ratón

1. Homogenización de sangre entera a alta velocidad durante 90 segundos en el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48 (Bio-Rad).
2. Añadir 1 µl del antibiótico ESPES Inyect (CASIER) por cada 2 ml de inóculo.
3. Realización de cultivo de los inóculos en placas de agar sangre para asegurar su esterilidad. Incubar a 37°C durante una noche.
4. Alicuotar inóculos y almacenar en congelación a -80°C.

Anexo 10. Preparación de inóculos de células blancas para bioensayo en ratón

1. Centrifugación a 1300g durante 15 minutos de la sangre con EDTA.
2. Extracción de la fase blanca con una pipeta pasteur.
3. Diluir en otro tubo esteril con 6ml de PBS autoclavado.
4. Añadir 3ml de Lymphoprep.
5. Centrifugación a 1300g durante 15 minutos.
6. Extracción de la interfase blanca.
7. Diluir en otro tubo estéril con 6ml de pbs autoclavado.
8. Centrifugación a 500g durante 10 minutos.
9. Decantar y resuspender el pelett en 0,5ml de H₂O MQ.
10. Añadir 8ml de PBS autoclavado.
11. Centrifugación a 500g durante 10 minutos.

Anexos

12. Decantar y resuspender el pelett en 400ul de PBS autoclavado.
13. Alicuotar inóculos y almacenar en congelación a -80°C.

Anexo 11. Preparación de inóculos de leche, suero y crema para bioensayo en ratón

1. Diluir cada muestra inicialmente (1/2 para leche y 1/5 para calostro) en PBS 10% acid citrate dextrose (Sigma Aldrich ref C3821) y 10mM EDTA-2K, homogeneizar por inversión.
2. Dejar reposar por 30 minutos a 4°C en la nevera
3. Retirar la crema con una espátula (una por muestra)
4. Con una pipeta Pasteur retirar la crema residual.
5. El líquido (Suero) debe ser aspirado y pasado por un filtro de 200mm y depositado en un tubo de 50ml.
6. Centrifugar el líquido a 2000 rpm 4°C por 5 minutos
7. Se almacena el sobrenadante (suero) a -80°C
8. Transferir el pellet a otro tubo de 50ml
9. Lavar las células 3 X (resuspender/centrifugar) en PBS.
10. Alicuotar inóculos y almacenar a -80°C

Anexo 12. Protocolo para la técnica de *Protein Mysfolding Cyclic Amplification* (PMCA)

- Preparación los sustratos (homogenizados de material sano):
 1. Pesar 1.5-1.9 g de cerebros sanos perfundidos y añadirlos junto con 10 volúmenes de tampón PMCA en un “potter” (homogenizador), para conseguir un homogenizado al 10%. Homogenizar cuidadosamente
 2. Verter el homogenizado en un Falcon de 50 ml
 3. Dejar los homogenizados reposando 1h en hielo para permitir que las membranas sean digeridas por el tritón del tampón PMCA
 4. Conservar a -80°C.

- Preparar las semillas (homogenizados de material infeccioso):
 1. Pesar 1.5-1.9 g de cerebros y añadirlos junto con la cantidad correspondiente de PBS en un tubo de homogenización con microcuentas de 1.5 ml de PBS para conseguir un homogenizado al 10%
 2. Someter a los tubos a 2-3 ciclos de homogenización en modo 2
 3. Alicuotar 100 µl del sobrenadante en eppendorfs de 1.5 ml
 4. Conservar a -20°C en posición vertical

- Dilución seriada 1:10 de las semillas:
 1. Preparar un strip con 8 microtubos para cada serie de diluciones, y colocar 90 µl de tampón PMCA en cada uno
 2. Coger 10 µl de la semilla y añadirlo al primer microtubo (dilución 10^{-1})
 3. Coger 10 µl de la nueva dilución y añadirla al siguiente microtubo (dilución 10^2). Continuar diluyendo seriadamente hasta dilución 10^{-8}

- Preparación de la placa de PMCA:
 1. Colocar un trozo de papel de aluminio sobre la poyata y una placa de 96 pocillos estéril para PMCA.
 2. Descongelar el sustrato al baño María 37°C
 3. Colocar una cuenta de teflón de 0.22 µm de diámetro en el fondo de cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Manejarlas con pinzas estériles.
 4. Homogenizar el sustrato descongelado con una pipeta de 1000 µl
 5. Verter el sustrato en una bañera y con una pipeta multicanal de 200 µl, colocar 45 µl de sustrato en cada pocillo. Usar pipeteo inverso
 - a. Si se usa sustrato con dextrano al 0.5%, mezclar 40 µl de sustrato con 5 µl de una solución de dextrano al 5%.
 6. Con una pipeta multicanal de 10 µl, coger 5 µl de cada microtubo de los strips preparados con la dilución de las semillas depositarlos en el pocillo correspondiente de la placa de PMCA. Mezclar bien mediante pipeteo
 7. Cerrar los pocillos con las tiras de tapas estériles
 8. Aislar la placa con parafilm

Anexos

- PMCA:

1. Asegurar que el circuito de agua está activado: baño maría y bomba peristáltica encendidos, T^a de la cámara de sonicador de mínimo 37°C y flujo constante
2. Colocar la placa en la gradilla del sonicador y colocar encima otra gradilla
3. Verificar que el nivel del agua de la corona del sonicador llega al nivel de la muestra en los pocillos de la placa
4. Colocar la tapa del sonicador y cerrar la cámara anecoica
5. Establecer los parámetros de sonicación. Para 24 horas: amplitud 75; tiempo total de sonicación: 16 min; tiempo de cada sonicación: 10 seg; tiempo entre cada sonicación: 14 min 50 seg

- Siguiendo ciclo de PMCA:

1. Preparar la nueva placa de PMCA con sustrato de la misma manera
2. Sacar la placa de PMCA del sonicador y centrifugarla para recuperar todo el volumen en el fondo de los pocillos
3. Retirar el parafilm y las filas de tapas evitando la propulsión de gotas y la contaminación de los pocillos
4. Coger 5 µl de cada pocillo y añadirlos a la nueva placa de PMCA y colocar en el sonicador
5. Cerrar la placa vieja con un papel film adhesivo con la referencia de la placa y guardar a -20°C

Referencias

Referencias

- Abu Rumeileh, S., Lattanzio, F., Stanzani Maserati, M., Rizzi, R., Capellari, S., & Parchi, P. (2017). Diagnostic Accuracy of a Combined Analysis of Cerebrospinal Fluid t-PrP, t-tau, p-tau, and A β 42 in the Differential Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease from Alzheimer's Disease with Emphasis on Atypical Disease Variants. *J. Alzheimer's Dis.*, 55(4), 1471-1480.
- Acin, C., Martin-Burriel, I., Monleon, E., Lyahyai, J., Pitarch, J. L., Serrano, C., Monzon, M., Zaragoza, P., & Badiola, J. J. (2013). Prion protein gene variability in Spanish goats. Inference through susceptibility to classical scrapie strains and pathogenic distribution of peripheral PrP(sc.). *PLoS One*, 8(4), e61118. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061118>
- Acutis, P. L., Martucci, F., D'Angelo, A., Peletto, S., Colussi, S., Maurella, C., Porcario, C., Iulini, B., Mazza, M., Dell'atti, L., Zuccon, F., Corona, C., Martinelli, N., Casalone, C., Caramelli, M., & Lombardi, G. (2012). Resistance to classical scrapie in experimentally challenged goats carrying mutation K222 of the prion protein gene. *Vet Res*, 43, 8. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-8>
- Adle-Biasette, H., Verney, C., Peoc'h, K., Dauge, M. C., Razavi, F., Choudat, L., Gressens, P., Budka, H., & Henin, D. (2006). Immunohistochemical expression of prion protein (PrPC) in the human forebrain during development. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65(7), 698-706. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228137.10531.72>
- Agren, E. O., Soren, K., Gavier-Widen, D., Benestad, S. L., Tran, L., Wall, K., Averhed, G., Doose, N., Vage, J., & Noremark, M. (2021). First Detection of Chronic Wasting Disease in Moose (Alces alces) in Sweden. *J Wildl Dis*, 57(2), 461-463. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00141>
- Agrimi, U., Conte, M., Morelli, L., Di Bari, M. A., Di Guardo, G., Ligios, C., Antonucci, G., Aufiero, G. M., Pozzato, N., Mutinelli, F., Nonno, R., & Vaccari, G. (2003). Animal transmissible spongiform encephalopathies and genetics. *Vet Res Commun*, 27 Suppl 1, 31-38. <https://doi.org/10.1023/b:verc.0000014115.18327.26>
- Aguilar-Calvo, P., Espinosa, J. C., Pintado, B., Gutiérrez-Adán, A., Alamillo, E., Miranda, A., Prieto, I., Bossers, A., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2014). Role of the goat K222-PrPC polymorphic variant in prion infection resistance. *Virology*, 88(5), 2670-2676.
- Aguilar-Calvo, P., Fast, C., Tauscher, K., Espinosa, J. C., Groschup, M. H., Nadeem, M., Goldmann, W., Langeveld, J., Bossers, A., Andreoletti, O., & Torres, J. M. (2015). Effect of Q211 and K222 PRNP Polymorphic Variants in the Susceptibility of Goats to Oral Infection With Goat Bovine Spongiform Encephalopathy. *J Infect Dis*, 212(4), 664-672. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv112>
- Aguzzi, A., & Calella, A. M. (2009). Prions: protein aggregation and infectious diseases. *Physiol Rev*, 89(4), 1105-1152. <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2009>
- Aguzzi, A., & Heikenwalder, M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol*, 4(10), 765-775. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1492>
- Almberg, E. S., Cross, P. C., Johnson, C. J., Heisey, D. M., & Richards, B. J. (2011). Modeling routes of chronic wasting disease transmission: environmental prion persistence promotes deer population decline and extinction. *PLoS One*, 6(5), e19896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019896>
- Alper, T., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, 22(3), 278-284. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(66\)90478-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(66)90478-5)
- Alpers, M. P. (2008). Review. The epidemiology of kuru: monitoring the epidemic from its peak to its end. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363(1510), 3707-3713. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0071>
- Andréoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J.-M., & Lantier, F. (2000). Early accumulation of PrPSc in gut-associated lymphoid

Referencias

- and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J. Gen. Virol*, 81(12), 3115-3126.
- Andreoletti, O., Simon, S., Lacroux, C., Morel, N., Tabouret, G., Chabert, A., Lugan, S., Corbiere, F., Ferre, P., Foucras, G., Laude, H., Eychenne, F., Grassi, J., & Schelcher, F. (2004). PrPSc accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med*, 10(6), 591-593. <https://doi.org/10.1038/nm1055>
- Angers, R. C., Kang, H.-E., Napier, D., Browning, S., Seward, T., Mathiason, C., Balachandran, A., McKenzie, D., Castilla, J., & Soto, C. (2010). Prion strain mutation determined by prion protein conformational compatibility and primary structure. *Science*, 328(5982), 1154-1158.
- Asante, E. A., Linehan, J. M., Desbruslais, M., Joiner, S., Gowland, I., Wood, A. L., Welch, J., Hill, A. F., Lloyd, S. E., & Wadsworth, J. D. (2002). BSE prions propagate as either variant CJD-like or sporadic CJD-like prion strains in transgenic mice expressing human prion protein. *EMBO J*, 21(23), 6358-6366.
- Barone, P., Antonini, A., Colosimo, C., Marconi, R., Morgante, L., Avarello, T. P., Bottacchi, E., Cannas, A., Ceravolo, G., & Ceravolo, R. (2009). The PRIAMO study: a multicenter assessment of nonmotor symptoms and their impact on quality of life in Parkinson's disease. *J. Mov. Disord*, 24(11), 1641-1649.
- Barria, M. A., Balachandran, A., Morita, M., Kitamoto, T., Barron, R., Manson, J., Knight, R., Ironside, J. W., & Head, M. W. (2014). Molecular barriers to zoonotic transmission of prions. *Emerg. Infect. Dis*, 20(1), 88.
- Bartz, J. C., Bessen, R. A., McKenzie, D., Marsh, R. F., & Aiken, J. M. (2000). Adaptation and selection of prion protein strain conformations following interspecies transmission of transmissible mink encephalopathy. *Virol. J.*, 74(12), 5542-5547.
- Bartz, J. C., McKenzie, D. I., Bessen, R. A., Marsh, R. F., & Aiken, J. M. (1994). Transmissible mink encephalopathy species barrier effect between ferret and mink: PrP gene and protein analysis. *J Gen Virol*, 75 (Pt 11), 2947-2953. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-11-2947>
- Baskakov, I. V. (2014). The many shades of prion strain adaptation. *Prion*, 8(2), 169-172.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Wälchli, M., Groth, D., McKinley, M., Prusiner, S., & Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46(3), 417-428.
- Basler, K., Oesch, B., Scott, M., Westaway, D., Walchli, M., Groth, D. F., McKinley, M. P., Prusiner, S. B., & Weissmann, C. (1986). Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*, 46(3), 417-428. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(86\)90662-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90662-8)
- Bassant, M., Cathala, F., Court, L., Gourmelon, P., & Hauw, J. (1984). Experimental scrapie in rats: first electrophysiological observations. *Electroencephalogr. clin. neurophysiol*, 57(6), 541-547.
- Bateman, D., Hilton, D., Love, S., Zeidler, M., Beck, J., & Collinge, J. (1995). Sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in a 18-year-old in the UK. *Lancet (British edition)*, 346(8983), 1155-1156.
- Beekes, M., & McBride, P. A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, 278(3), 181-184. [https://doi.org/10.1016/s0304-3940\(99\)00934-9](https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00934-9)
- Beekes, M., McBride, P. A., & Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, 79 (Pt 3), 601-607. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-3-601>
- Bell, J. E., & Ironside, J. W. (1993). Neuropathology of spongiform encephalopathies in humans. *Br Med Bull*, 49(4), 738-777. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072645>
- Bellworthy, S. J., Hawkins, S. A., Green, R. B., Blamire, I., Dexter, G., Dexter, I., Lockey, R., Jeffrey, M., Ryder, S., Berthelin-Baker, C., & Simmons, M. M. (2005). Tissue distribution of

Referencias

- bovine spongiform encephalopathy infectivity in Romney sheep up to the onset of clinical disease after oral challenge. *Vet Rec*, 156(7), 197-202. <https://doi.org/10.1136/vr.156.7.197>
- Belt, P. B., Muileman, I. H., Schreuder, B. E., Bos-de Ruijter, J., Gielkens, A. L., & Smits, M. A. (1995). Identification of five allelic variants of the sheep PrP gene and their association with natural scrapie. *J Gen Virol*, 76 (Pt 3), 509-517. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-3-509>
- Bencsik, A., Lezmi, S., & Baron, T. (2001). Autonomic nervous system innervation of lymphoid territories in spleen: a possible involvement of noradrenergic neurons for prion neuroinvasion in natural scrapie. *J Neurovirol*, 7(5), 447-453. <https://doi.org/10.1080/135502801753170309>
- Bencsik, A., Lezmi, S., Hunsmann, G., & Baron, T. (2001). Close vicinity of PrP expressing cells (FDC) with noradrenergic fibers in healthy sheep spleen. *Dev Immunol*, 8(3-4), 235-241. <https://doi.org/10.1155/2001/40871>
- Benestad, S., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., & Vikoren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, 47(1), 88. <https://doi.org/10.1186/s13567-016-0375-4>
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A., & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*, 153(7), 202-208. <https://doi.org/10.1136/vr.153.7.202>
- Beringue, V., Herzog, L., Jaumain, E., Reine, F., Sibille, P., Le Dur, A., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2012). Facilitated cross-species transmission of prions in extraneural tissue. *Science*, 335(6067), 472-475. <https://doi.org/10.1126/science.1215659>
- Beringue, V., Herzog, L., Reine, F., Le Dur, A., Casalone, C., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2008). Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerg Infect Dis*, 14(12), 1898-1901. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080941>
- Béringue, V., Le Dur, A., Tixador, P., Reine, F., Lepourry, L., Perret-Liaudet, A., Haïk, S., Vilotte, J.-L., Fontés, M., & Laude, H. (2008). Prominent and persistent extraneural infection in human PrP transgenic mice infected with variant CJD. *PLoS one*, 3(1), e1419.
- Bert, J., Vuillon-Cacciuttolo, G., Balzamo, E., De Micco, P., Gambarelli, D., Tamalet, J., & Gastaut, H. (1978). Experimental kuru in the rhesus monkey: A study of eeg modifications in the waking state and during sleep. *Electroencephalogr. clin. neurophysiol*, 45(5), 611-620.
- Bessen, R. A., & Marsh, R. F. (1992). Biochemical and physical properties of the prion protein from two strains of the transmissible mink encephalopathy agent. *J Virol*, 66(4), 2096-2101. <https://doi.org/10.1128/JVI.66.4.2096-2101.1992>
- Bett, C., Fernandez-Borges, N., Kurt, T. D., Lucero, M., Nilsson, K. P., Castilla, J., & Sigurdson, C. J. (2012). Structure of the beta2-alpha2 loop and interspecies prion transmission. *FASEB J*, 26(7), 2868-2876. <https://doi.org/10.1096/fj.11-200923>
- Biacabe, A. G., Laplanche, J. L., Ryder, S., & Baron, T. (2004). Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*, 5(1), 110-115. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400054>
- Bian, J., Khaychuk, V., Angers, R. C., Fernandez-Borges, N., Vidal, E., Meyerett-Reid, C., Kim, S., Calvi, C. L., Bartz, J. C., Hoover, E. A., Agrimi, U., Richt, J. A., Castilla, J., & Telling, G. C. (2017). Prion replication without host adaptation during interspecies transmissions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(5), 1141-1146. <https://doi.org/10.1073/pnas.1611891114>
- Bian, J., Kim, S., Kane, S. J., Crowell, J., Sun, J. L., Christiansen, J., Saijo, E., Moreno, J. A., DiLisio, J., Burnett, E., Pritzkow, S., Gorski, D., Soto, C., Kreeger, T. J., Balachandran, A., Mitchell, G., Miller, M. W., Nonno, R., Vikoren, T., Vage, J., Madslie, K., Tran, L., Vuong, T. T., Benestad, S. L., & Telling, G. C. (2021). Adaptive selection of a prion strain conformer corresponding to established North American CWD during propagation of novel emergent Norwegian strains in mice expressing elk or deer prion protein. *PLoS Pathog*, 17(7), e1009748. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009748>

Referencias

- Billinis, C., Panagiotidis, C. H., Psychas, V., Argyroudis, S., Nicolaou, A., Leontides, S., Papadopoulos, O., & Sklaviadis, T. (2002). Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie. *J Gen Virol*, 83(Pt 3), 713-721. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-3-713>
- Bishop, M., Hart, P., Aitchison, L., Baybutt, H., Plinston, C., Thomson, V., Tuzi, N. L., Head, M., Ironside, J., & Will, R. (2006). Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol*, 5(5), 393-398.
- Bossers, A., Belt, P., Raymond, G. J., Caughey, B., de Vries, R., & Smits, M. A. (1997). Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 4931-4936. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4931>
- Bossers, A., Schreuder, B. E., Muileman, I. H., Belt, P. B., & Smits, M. A. (1996). PrP genotype contributes to determining survival times of sheep with natural scrapie. *J Gen Virol*, 77 (Pt 10), 2669-2673. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-10-2669>
- Bouzalas, I. G., Dovas, C. I., Banos, G., Papanastasopoulou, M., Kritas, S., Oevermann, A., Papakostaki, D., Evangelia, C., Papadopoulos, O., Seuberlich, T., & Koptopoulos, G. (2010). Caprine PRNP polymorphisms at codons 171, 211, 222 and 240 in a Greek herd and their association with classical scrapie. *J Gen Virol*, 91(Pt 6), 1629-1634. <https://doi.org/10.1099/vir.0.017350-0>
- Braak, H., Del Tredici, K., Rüb, U., De Vos, R. A., Steur, E. N. J., & Braak, E. (2003). Staging of brain pathology related to sporadic Parkinson's disease. *Neurobiol. Aging*, 24(2), 197-211.
- Brown, D. R., Schulz-Schaeffer, W. J., Schmidt, B., & Kretzschmar, H. A. (1997). Prion protein-deficient cells show altered response to oxidative stress due to decreased SOD-1 activity. *Exp Neurol*, 146(1), 104-112. <https://doi.org/10.1006/exnr.1997.6505>
- Brown, P., Preece, M. A., & Will, R. G. (1992). "Friendly fire" in medicine: hormones, homografts, and Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 340(8810), 24-27. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)92431-e](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)92431-e)
- Bruce, M., Chree, A., McConnell, I., Foster, J., Pearson, G., & Fraser, H. (1994). Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice: strain variation and the species barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 343(1306), 405-411. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0036>
- Bruce, M. E. (1993). Scrapie strain variation and mutation. *Br Med Bull*, 49(4), 822-838. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072649>
- Bruce, M. E., & Dickinson, A. G. (1987). Biological evidence that scrapie agent has an independent genome. *J Gen Virol*, 68 (Pt 1), 79-89. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-1-79>
- Bruce, M. E., & Fraser, H. (1991). Scrapie strain variation and its implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 172, 125-138. https://doi.org/10.1007/978-3-642-76540-7_8
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J. W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., & Bostock, C. J. (1997). Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389(6650), 498-501. <https://doi.org/10.1038/39057>
- Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, 73(7), 1339-1347. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90360-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90360-3)
- Burgold, J., Schulz-Trieglaff, E. K., Voelkl, K., Gutiérrez-Ángel, S., Bader, J. M., Hosp, F., Mann, M., Arzberger, T., Klein, R., & Liebscher, S. (2019). Cortical circuit alterations precede motor impairments in Huntington's disease mice. *Sci. Rep*, 9(1), 6634.
- Buschmann, A., & Groschup, M. H. (2005). Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis*, 192(5), 934-942. <https://doi.org/10.1086/431602>

Referencias

- Carlson, C. M., Hopkins, M. C., Nguyen, N. T., Richards, B. J., Walsh, D. P., & Walter, W. D. (2018). *Chronic wasting disease: status, science, and management support by the US Geological Survey*. US Department of the Interior, US Geological Survey.
- Casalone, C., Corona, C., Crescio, M. I., Martucci, F., Mazza, M., Ru, G., Bozzetta, E., Acutis, P. L., & Caramelli, M. (2005). Pathological prion protein in the tongues of sheep infected with naturally occurring scrapie. *J Virol*, 79(9), 5847-5849. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5847-5849.2005>
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S., & Caramelli, M. (2004). Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 3065-3070. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305777101>
- Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., & Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*, 5, 5821. <https://doi.org/10.1038/ncomms6821>
- Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, 121(2), 195-206. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.011>
- Castle, A. R., & Gill, A. C. (2017). Physiological functions of the cellular prion protein. *Front. Mol. Biosci.*, 4, 19.
- Caughey, B., Race, R. E., Ernst, D., Buchmeier, M. J., & Chesebro, B. (1989). Prion protein biosynthesis in scrapie-infected and uninfected neuroblastoma cells. *J Virol*, 63(1), 175-181. <https://doi.org/10.1128/JVI.63.1.175-181.1989>
- Chandler, R. L. (1961). Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material. *Lancet*, 1(7191), 1378-1379. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(61\)92008-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(61)92008-6)
- Chatelain, J., Cathala, F., Brown, P., Raharison, S., Court, L., & Gajdusek, D. C. (1981). Epidemiologic comparisons between Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie in France during the 12-year period 1968-1979. *J Neurol Sci*, 51(3), 329-337. [https://doi.org/10.1016/0022-510x\(81\)90111-8](https://doi.org/10.1016/0022-510x(81)90111-8)
- Chelle, P. (1942). A case of trembling in the goat. *Bull Acad Vet France*, 15, 294-295.
- Cockcroft, P. D. (2004). The similarity of the physical sign frequencies of bovine spongiform encephalopathy and selected differential diagnoses. *Vet J*, 167(2), 175-180. [https://doi.org/10.1016/S1090-0233\(02\)00300-3](https://doi.org/10.1016/S1090-0233(02)00300-3)
- Collie, D. A., Summers, D. M., Sellar, R. J., Ironside, J. W., Cooper, S., Zeidler, M., Knight, R., & Will, R. G. (2003). Diagnosing variant Creutzfeldt-Jakob disease with the pulvinar sign: MR imaging findings in 86 neuropathologically confirmed cases. *AJNR Am J Neuroradiol*, 24(8), 1560-1569. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13679271>
- Collinge, J. (1999). Variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 354(9175), 317-323. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)05128-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)05128-4)
- Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, 318(5852), 930-936. <https://doi.org/10.1126/science.1138718>
- Collinge, J., Palmer, M. S., & Dryden, A. J. (1991). Genetic predisposition to iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 337(8755), 1441-1442. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93128-v](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93128-v)
- Collinge, J., Palmer, M. S., Sidle, K. C., Hill, A. F., Gowland, I., Meads, J., Asante, E., Bradley, R., Doey, L. J., & Lantos, P. L. (1995). Unaltered susceptibility to BSE in transgenic mice expressing human prion protein. *Nature*, 378(6559), 779-783. <https://doi.org/10.1038/378779a0>
- Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, 383(6602), 685-690. <https://doi.org/10.1038/383685a0>
- Collins, S., McLean, C. A., & Masters, C. L. (2001). Gerstmann-Straussler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia, and kuru: a review of these less common human

Referencias

- transmissible spongiform encephalopathies. *J Clin Neurosci*, 8(5), 387-397. <https://doi.org/10.1054/jocn.2001.0919>
- Criado, J. R., Sanchez-Alavez, M., Conti, B., Giacchino, J. L., Wills, D. N., Henriksen, S. J., Race, R., Manson, J. C., Chesebro, B., & Oldstone, M. B. (2005). Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons. *Neurobiol Dis*, 19(1-2), 255-265. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.01.001>
- Cuillé, J. (1936). Pathologie animal-la maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable? *CR Acad. Sci.(Paris)*, 203, 1552-1554.
- Cuillé, J. (1938). La tremblante du mouton est bien inoculable. *CR Acad. Sci.(Paris)*, 206, 78-79.
- Cuillé, J., & Chelle, P.-L. (1938). La tremblante du mouton est-elle determinee par un virus filterable. *CR Acad Sci (Paris)*, 206, 1687-1688.
- Curnow, R. N., & Hau, C. M. (1996). The incidence of bovine spongiform encephalopathy in the progeny of affected sires and dams. *Vet Rec*, 138(17), 407-408. <https://doi.org/10.1136/vr.138.17.407>
- da Luz, M. H., Peres, I. T., Santos, T. G., Martins, V. R., Icimoto, M. Y., & Lee, K. S. (2015). Dopamine induces the accumulation of insoluble prion protein and affects autophagic flux. *Front Cell Neurosci*, 9, 12. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00012>
- Detwiler, L. A. (1992). Scrapie. *Rev Sci Tech*, 11(2), 491-537. <https://doi.org/10.20506/rst.11.2.607>
- Detwiler, L. A., & Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, 22(1), 121-143. <https://doi.org/10.20506/rst.22.1.1386>
- Dickinson, A. G., Stamp, J. T., Renwick, C. C., & Rennie, J. C. (1968). Some factors controlling the incidence of scrapie in Cheviot sheep injected with a Cheviot-passaged scrapie agent. *J Comp Pathol*, 78(3), 313-321. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(68\)90007-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(68)90007-8)
- Dobson, C. M. (2003). Protein folding and misfolding. *Nature*, 426(6968), 884-890.
- Doh-ura, K., Tateishi, J., Sasaki, H., Kitamoto, T., & Sakaki, Y. (1989). Pro----leu change at position 102 of prion protein is the most common but not the sole mutation related to Gerstmann-Straussler syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*, 163(2), 974-979. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)92317-6](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92317-6)
- Dorey, A., Tholance, Y., Vighetto, A., Perret-Liaudet, A., Lachman, I., Krolak-Salmon, P., Wagner, U., Struyfs, H., De Deyn, P. P., & El-Moualij, B. (2015). Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between Alzheimer disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA Neurol*, 72(3), 267-275.
- Dufort-Gervais, J., Mongrain, V., & Brouillette, J. (2019). Bidirectional relationships between sleep and amyloid-beta in the hippocampus. *Neurobiol. Learn. Mem*, 160, 108-117.
- Dugger, B. N., & Dickson, D. W. (2017). Pathology of neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(7), a028035.
- El Sammak, S., Attarian, H., Taype-Roberts, C., & Standlee, J. (2022). REM sleep behavior disorder as a remote precedent to Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurol. Sci*, 43(9), 5647-5649.
- Eloit, M., Adjou, K., Culpier, M., Fontaine, J. J., Hamel, R., Lilin, T., Messiaen, S., Andreoletti, O., Baron, T., Bencsik, A., Biacabe, A. G., Beringue, V., Laude, H., Le Dur, A., Vilotte, J. L., Comoy, E., Deslys, J. P., Grassi, J., Simon, S., Lantier, F., & Sarradin, P. (2005). BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec*, 156(16), 523-524. <https://doi.org/10.1136/vr.156.16.523-b>
- Ersdal, C., Ulvund, M., Benestad, S., & Tranulis, M. (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrP^{Sc}) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet. Pathol*, 40(2), 164-174.
- Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Castilla, J., Herva, M. E., Morales, M., Alamillo, E., San-Segundo, F. D., Lacroux, C., Lugan, S., Salguero, F. J., Langeveld, J., & Torres, J. M. (2007). Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. *J Virol*, 81(2), 835-843. <https://doi.org/10.1128/JVI.01356-06>

Referencias

- Everest, S. J., Ramsay, A. M., Chaplin, M. J., Everitt, S., Stack, M. J., Neale, M. H., Jeffrey, M., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., & Terry, L. A. (2011). Detection and localisation of PrP(Sc) in the liver of sheep infected with scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One*, 6(5), e19737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019737>
- Fernández-Borges, N., Parra, B., Vidal, E., Eraña, H., Sánchez-Martín, M. A., de Castro, J., Elezgarai, S. R., Pumarola, M., Mayoral, T., & Castilla, J. (2017). Unraveling the key to the resistance of canids to prion diseases. *PLoS Pathog*, 13(11), e1006716.
- Foster, J., Wilson, M., & Hunter, N. (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet. Rec*, 139(21), 512-515.
- Foster, J. D., & Dickinson, A. G. (1988). The unusual properties of CH1641, a sheep-passaged isolate of scrapie. *Vet Rec*, 123(1), 5-8. <https://doi.org/10.1136/vr.123.1.5>
- Foster, J. D., Hope, J., & Fraser, H. (1993). Transmission of bovine spongiform encephalopathy to sheep and goats. *Vet Rec*, 133(14), 339-341. <https://doi.org/10.1136/vr.133.14.339>
- Foster, J. D., Hunter, N., Williams, A., Mylne, M. J., McKelvey, W. A., Hope, J., Fraser, H., & Bostock, C. (1996). Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec*, 138(23), 559-562. <https://doi.org/10.1136/vr.138.23.559>
- Foster, J. D., Parnham, D. W., Hunter, N., & Bruce, M. (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, 82(Pt 10), 2319-2326. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2319>
- Fraser, H. (1993). Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull*, 49(4), 792-809. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072647>
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*, 78(3), 301-311. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(68\)90006-6](https://doi.org/10.1016/0021-9975(68)90006-6)
- Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol*, 83(1), 29-40. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(73\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0021-9975(73)90024-8)
- Frisoni, G. B., Altomare, D., Thal, D. R., Ribaldi, F., van der Kant, R., Ossenkoppele, R., Blennow, K., Cummings, J., van Duijn, C., & Nilsson, P. M. (2022). The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nat. Rev. Neurosci*, 23(1), 53-66.
- Gambetti, P., Kong, Q., Zou, W., Parchi, P., & Chen, S. G. (2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. *Br Med Bull*, 66, 213-239. <https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.213>
- Ganley, R. P., Iwagaki, N., del Rio, P., Baseer, N., Dickie, A. C., Boyle, K. A., Polgar, E., Watanabe, M., Abaira, V. E., Zimmerman, A., Riddell, J. S., & Todd, A. J. (2015). Inhibitory Interneurons That Express GFP in the PrP-GFP Mouse Spinal Cord Are Morphologically Heterogeneous, Innervated by Several Classes of Primary Afferent and Include Lamina I Projection Neurons among Their Postsynaptic Targets. *J Neurosci*, 35(19), 7626-7642. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0406-15.2015>
- Garza, M. C., Monzon, M., Marin, B., Badiola, J. J., & Monleon, E. (2014). Distribution of peripheral PrP(Sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PLoS One*, 9(5), e97768. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097768>
- Gibbs, C. J., Jr., Gajdusek, D. C., Asher, D. M., Alpers, M. P., Beck, E., Daniel, P. M., & Matthews, W. B. (1968). Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science*, 161(3839), 388-389. <https://doi.org/10.1126/science.161.3839.388>
- Giles, K., Glidden, D. V., Patel, S., Korth, C., Groth, D., Lemus, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2010). Human prion strain selection in transgenic mice. *Ann Neurol*, 68(2), 151-161. <https://doi.org/10.1002/ana.22104>
- Givaty, G., Maggio, N., Cohen, O. S., Blatt, I., & Chapman, J. (2016). Early pathology in sleep studies of patients with familial Creutzfeldt-Jakob disease. *J. Sleep Res*, 25(5), 571-575.

Referencias

- Glatzel, M., & Aguzzi, A. (2001). The shifting biology of prions. *Brain Res Brain Res Rev*, 36(2-3), 241-248. [https://doi.org/10.1016/s0165-0173\(01\)00100-x](https://doi.org/10.1016/s0165-0173(01)00100-x)
- Glatzel, M., Stoeck, K., Seeger, H., Luhrs, T., & Aguzzi, A. (2005). Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol*, 62(4), 545-552. <https://doi.org/10.1001/archneur.62.4.545>
- Goldgaber, D., Goldfarb, L. G., Brown, P., Asher, D. M., Brown, W. T., Lin, S., Teener, J. W., Feinstone, S. M., Rubenstein, R., Kascsak, R. J., & et al. (1989). Mutations in familial Creutzfeldt-Jakob disease and Gerstmann-Straussler-Scheinker's syndrome. *Exp Neurol*, 106(2), 204-206. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(89\)90095-2](https://doi.org/10.1016/0014-4886(89)90095-2)
- Goldmann, W., Martin, T., Foster, J., Hughes, S., Smith, G., Hughes, K., Dawson, M., & Hunter, N. (1996). Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period. *J Gen Virol*, 77 (Pt 11), 2885-2891. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2885>
- Goldmann, W., Ryan, K., Stewart, P., Parnham, D., Xicohtencatl, R., Fernandez, N., Saunders, G., Windl, O., Gonzalez, L., Bossers, A., & Foster, J. (2011). Caprine prion gene polymorphisms are associated with decreased incidence of classical scrapie in goat herds in the United Kingdom. *Vet Res*, 42, 110. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-110>
- Gonzalez, L., Dagleish, M. P., Martin, S., Dexter, G., Steele, P., Finlayson, J., & Jeffrey, M. (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet Rec*, 162(13), 397-403. <https://doi.org/10.1136/vr.162.13.397>
- Gonzalez, L., Jeffrey, M., Dagleish, M. P., Goldmann, W., Siso, S., Eaton, S. L., Martin, S., Finlayson, J., Stewart, P., Steele, P., Pang, Y., Hamilton, S., Reid, H. W., & Chianini, F. (2012). Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-PRNP genotype experimental transmissions with natural sources. *Vet Res*, 43, 55. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-55>
- Gonzalez, L., Jeffrey, M., Siso, S., Martin, S., Bellworthy, S. J., Stack, M. J., Chaplin, M. J., Davis, L., Dagleish, M. P., & Reid, H. W. (2005). Diagnosis of preclinical scrapie in samples of rectal mucosa. *Vet Rec*, 156(26), 846-847. <https://doi.org/10.1136/vr.156.26.846-b>
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., & Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*, 126(1), 17-29. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0516>
- Gonzalez, L., Martin, S., Hawkins, S. A., Goldmann, W., Jeffrey, M., & Siso, S. (2010). Pathogenesis of natural goat scrapie: modulation by host PRNP genotype and effect of co-existent conditions. *Vet Res*, 41(4), 48. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010020>
- González, L., Martin, S., Sisó, S., Konold, T., Ortiz-Peláez, A., Phelan, L., Goldmann, W., Stewart, P., Saunders, G., & Windl, O. (2009). High prevalence of scrapie in a dairy goat herd: tissue distribution of disease-associated PrP and effect of PRNP genotype and age. *Vet. Res*, 40(6).
- Gonzalez, L., Pitarch, J. L., Martin, S., Thurston, L., Simmons, H., Acin, C., & Jeffrey, M. (2014). Influence of polymorphisms in the prion protein gene on the pathogenesis and neuropathological phenotype of sheep scrapie after oral infection. *J Comp Pathol*, 150(1), 57-70. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.10.001>
- Gonzalez, L., Siso, S., Monleon, E., Casalone, C., van Keulen, L. J., Balkema-Buschmann, A., Ortiz-Pelaez, A., Iulini, B., Langeveld, J. P., Hoffmann, C., Badiola, J. J., Jeffrey, M., & Acin, C. (2010). Variability in disease phenotypes within a single PRNP genotype suggests the existence of multiple natural sheep scrapie strains within Europe. *J Gen Virol*, 91(Pt 10), 2630-2641. <https://doi.org/10.1099/vir.0.022574-0>
- Gough, K. C., Baker, C. A., Rees, H. C., Terry, L. A., Spiropoulos, J., Thorne, L., & Maddison, B. C. (2012). The oral secretion of infectious scrapie prions occurs in preclinical sheep with a range of PRNP genotypes. *J Virol*, 86(1), 566-571. <https://doi.org/10.1128/JVI.05579-11>

Referencias

- Green, K. M., Browning, S. R., Seward, T. S., Jewell, J. E., Ross, D. L., Green, M. A., Williams, E. S., Hoover, E. A., & Telling, G. C. (2008). The elk PRNP codon 132 polymorphism controls cervid and scrapie prion propagation. *J Gen Virol*, 89(Pt 2), 598-608. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83168-0>
- Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, 215(5105), 1043-1044. <https://doi.org/10.1038/2151043a0>
- Groschup, M. H., Weiland, F., Straub, O. C., & Pfaff, E. (1996). Detection of scrapie agent in the peripheral nervous system of a diseased sheep. *Neurobiol Dis*, 3(3), 191-195. <https://doi.org/10.1006/nbdi.1996.0019>
- Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., & Caughey, B. (2014). Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*, 289(35), 24129-24142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578344>
- Guere, M. E., Vage, J., Tharaldsen, H., Benestad, S. L., Vikoren, T., Madslie, K., Hopp, P., Rolandsen, C. M., Roed, K. H., & Tranulis, M. A. (2020). Chronic wasting disease associated with prion protein gene (PRNP) variation in Norwegian wild reindeer (Rangifer tarandus). *Prion*, 14(1), 1-10. <https://doi.org/10.1080/19336896.2019.1702446>
- Gurgul, A., Czarnik, U., Larska, M., Polak, M. P., Strychalski, J., & Slota, E. (2012). Polymorphism of the prion protein gene (PRNP) in Polish cattle affected by classical bovine spongiform encephalopathy. *Mol Biol Rep*, 39(5), 5211-5217. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1318-9>
- Haase, B., Doherr, M. G., Seuberlich, T., Drogemuller, C., Dolf, G., Nicken, P., Schiebel, K., Ziegler, U., Groschup, M. H., Zurbriggen, A., & Leeb, T. (2007). PRNP promoter polymorphisms are associated with BSE susceptibility in Swiss and German cattle. *BMC Genet*, 8, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-15>
- Hadlow, W. J. (1995). Neuropathology and the scrapie-kuru connection. *Brain Pathol*, 5(1), 27-31. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00574.x>
- Hadlow, W. J., Kennedy, R. C., Race, R. E., & Eklund, C. M. (1980). Virologic and neurohistologic findings in dairy goats affected with natural scrapie. *Vet Pathol*, 17(2), 187-199. <https://doi.org/10.1177/030098588001700207>
- Haley, N. J., Merrett, K., Buros Stein, A., Simpson, D., Carlson, A., Mitchell, G., Staskevicius, A., Nichols, T., Lehmkuhl, A. D., & Thomsen, B. V. (2019). Estimating relative CWD susceptibility and disease progression in farmed white-tailed deer with rare PRNP alleles. *PLoS One*, 14(12), e0224342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224342>
- Haley, N. J., Seelig, D. M., Zabel, M. D., Telling, G. C., & Hoover, E. A. (2009). Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay. *PLoS One*, 4(3), e4848. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004848>
- Hamir, A. N., Gidlewski, T., Spraker, T. R., Miller, J. M., Creekmore, L., Crocheck, M., Cline, T., & O'Rourke, K. I. (2006). Preliminary observations of genetic susceptibility of elk (*Cervus elaphus nelsoni*) to chronic wasting disease by experimental oral inoculation. *J Vet Diagn Invest*, 18(1), 110-114. <https://doi.org/10.1177/104063870601800118>
- Hamir, A. N., Miller, J. M., Cutlip, R. C., Kunkle, R. A., Jenny, A. L., Stack, M. J., Chaplin, M. J., & Richt, J. A. (2004). Transmission of sheep scrapie to elk (*Cervus elaphus nelsoni*) by intracerebral inoculation: final outcome of the experiment. *J Vet Diagn Invest*, 16(4), 316-321. <https://doi.org/10.1177/104063870401600410>
- Hastings, M. H., & Goedert, M. (2013). Circadian clocks and neurodegenerative diseases: time to aggregate? *Curr. Opin. Neurobiol*, 23(5), 880-887.
- Hatfield, C. F., Herbert, J., Van Someren, E., Hodges, J., & Hastings, M. (2004). Disrupted daily activity/rest cycles in relation to daily cortisol rhythms of home-dwelling patients with early Alzheimer's dementia. *Brain*, 127(5), 1061-1074.

Referencias

- Heggebo, R., Gonzalez, L., Press, C. M., Gunnes, G., Espenes, A., & Jeffrey, M. (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 84(Pt 5), 1327-1338. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18874-0>
- Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 83(Pt 2), 479-489. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-479>
- Hermann, P., Appleby, B., Brandel, J.-P., Caughey, B., Collins, S., Geschwind, M. D., Green, A., Haïk, S., Kovacs, G. G., & Ladogana, A. (2021). Biomarkers and diagnostic guidelines for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Neurol*, 20(3), 235-246.
- Hill, A. F., & Collinge, J. (2003). Subclinical prion infection in humans and animals. *Br. Med. Bull*, 66(1), 161-170.
- Hill, A. F., Desbruslais, M., Joiner, S., Sidle, K. C., Gowland, I., Collinge, J., Doey, L. J., & Lantos, P. (1997). The same prion strain causes vCJD and BSE. *Nature*, 389(6650), 448-450, 526. <https://doi.org/10.1038/38925>
- Hill, A. F., Joiner, S., Linehan, J., Desbruslais, M., Lantos, P. L., & Collinge, J. (2000). Species-barrier-independent prion replication in apparently resistant species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(18), 10248-10253. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.18.10248>
- Hoffmann, C., Eiden, M., Kaatz, M., Keller, M., Ziegler, U., Rogers, R., Hills, B., Balkema-Buschmann, A., van Keulen, L., Jacobs, J. G., & Groschup, M. H. (2011). BSE infectivity in jejunum, ileum and ileocaecal junction of incubating cattle. *Vet Res*, 42, 21. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-21>
- Hoffmann, C., Ziegler, U., Buschmann, A., Weber, A., Kupfer, L., Oelschlegel, A., Hammerschmidt, B., & Groschup, M. H. (2007). Prions spread via the autonomic nervous system from the gut to the central nervous system in cattle incubating bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 88(Pt 3), 1048-1055. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82186-0>
- Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, 15(3), 827-852. <https://doi.org/10.20506/rst.15.3.959>
- Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, 112(12), 4739-4745. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-152520>
- Hoyt, F., Standke, H. G., Artakis, E., Schwartz, C. L., Hansen, B., Li, K., Hughson, A. G., Manca, M., Thomas, O. R., & Raymond, G. J. (2022). Cryo-EM structure of anchorless RML prion reveals variations in shared motifs between distinct strains. *Nat. Commun*, 13(1), 4005.
- Hunter, N. (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, 5(8), 331-334. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(97\)01081-0](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)01081-0)
- Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., & Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*, 83(Pt 11), 2897-2905. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2897>
- Hunter, N., Foster, J. D., Goldmann, W., Stear, M. J., Hope, J., & Bostock, C. (1996). Natural scrapie in a closed flock of Cheviot sheep occurs only in specific PrP genotypes. *Arch Virol*, 141(5), 809-824. <https://doi.org/10.1007/BF01718157>
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011a). An overview of animal prion diseases. *Viol J*, 8, 493. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-493>
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011b). An overview of human prion diseases. *Viol J*, 8, 559. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-559>
- Iranzo, A., & Santamaria, J. (2015). Sleep in neurodegenerative diseases. *Sleep Medicine: A Comprehensive Guide to Its Development, Clinical Milestones, and Advances in Treatment*, 271-283.
- Ironside, J. W., & Head, M. W. (2008). Biology and neuropathology of prion diseases. *Handb Clin Neurol*, 89, 779-797. [https://doi.org/10.1016/S0072-9752\(07\)01268-7](https://doi.org/10.1016/S0072-9752(07)01268-7)

Referencias

- Jarrett, J. T., & Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, 73(6), 1055-1058. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90635-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90635-4)
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M., & Gonzalez, L. (2002). Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J. Comp. Pathol*, 127(4), 264-273.
- Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2004). Pathology and pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy and scrapie. *Curr Top Microbiol Immunol*, 284, 65-97. https://doi.org/10.1007/978-3-662-08441-0_3
- Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 33(4), 373-394. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00868.x>
- Jeffrey, M., Martin, S., & Gonzalez, L. (2003). Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, 84(Pt 4), 1033-1046. <https://doi.org/10.1099/vir.0.18825-0>
- Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Foster, J., Langeveld, J. P., van Zijderveld, F. G., Grassi, J., & Hunter, N. (2006). Immunohistochemical features of PrP(d) accumulation in natural and experimental goat transmissible spongiform encephalopathies. *J Comp Pathol*, 134(2-3), 171-181. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.10.003>
- Jeffrey, M., Martin, S., Thomson, J. R., Dingwall, W. S., Begara-McGorum, I., & Gonzalez, L. (2001). Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*, 125(1), 48-57. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0476>
- Jeong, B. H., Lee, K. H., Kim, N. H., Jin, J. K., Kim, J. I., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2005). Association of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease with homozygous genotypes at PRNP codons 129 and 219 in the Korean population. *Neurogenetics*, 6(4), 229-232. <https://doi.org/10.1007/s10048-005-0016-y>
- Jeong, H. J., Lee, J. B., Park, S. Y., Song, C. S., Kim, B. S., Rho, J. R., Yoo, M. H., Jeong, B. H., Kim, Y. S., & Choi, I. S. (2007). Identification of single-nucleotide polymorphisms of the prion protein gene in sika deer (*Cervus nippon laiouanus*). *J Vet Sci*, 8(3), 299-301. <https://doi.org/10.4142/jvs.2007.8.3.299>
- Jewell, J. E., Conner, M. M., Wolfe, L. L., Miller, M. W., & Williams, E. S. (2005). Low frequency of PrP genotype 225SF among free-ranging mule deer (*Odocoileus hemionus*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 86(Pt 8), 2127-2134. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81077-0>
- Johnson, C., Johnson, J., Clayton, M., McKenzie, D., & Aiken, J. (2003). Prion protein gene heterogeneity in free-ranging white-tailed deer within the chronic wasting disease affected region of Wisconsin. *J Wildl Dis*, 39(3), 576-581. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.3.576>
- Johnson, C., Johnson, J., Vanderloo, J. P., Keane, D., Aiken, J. M., & McKenzie, D. (2006). Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 87(Pt 7), 2109-2114. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81615-0>
- Ju, Y.-E. S., Lucey, B. P., & Holtzman, D. M. (2014). Sleep and Alzheimer disease pathology—a bidirectional relationship. *Nat. Rev. Neurol*, 10(2), 115.
- Ju, Y.-E. S., McLeland, J. S., Toedebusch, C. D., Xiong, C., Fagan, A. M., Duntley, S. P., Morris, J. C., & Holtzman, D. M. (2013). Sleep quality and preclinical Alzheimer disease. *JAMA Neurol*, 70(5), 587-593.
- Juling, K., Schwarzenbacher, H., Williams, J. L., & Fries, R. (2006). A major genetic component of BSE susceptibility. *BMC Biol*, 4, 33. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-4-33>

Referencias

- Kaski, D., Mead, S., Hyare, H., Cooper, S., Jampana, R., Overell, J., Knight, R., Collinge, J., & Rudge, P. (2009). Variant CJD in an individual heterozygous for PRNP codon 129. *Lancet*, 374(9707), 2128. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61568-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61568-3)
- Khalili-Shirazi, A., Summers, L., Linehan, J., Mallinson, G., Anstee, D., Hawke, S., Jackson, G. S., & Collinge, J. (2005). PrP glycoforms are associated in a strain-specific ratio in native PrPSc. *J Gen Virol*, 86(Pt 9), 2635-2644. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80375-0>
- Khan, M. Q., Sweeting, B., Mulligan, V. K., Arslan, P. E., Cashman, N. R., Pai, E. F., & Chakrabarty, A. (2010). Prion disease susceptibility is affected by β -structure folding propensity and local side-chain interactions in PrP. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 107(46), 19808-19813.
- Kim, B. H., Lee, H. G., Choi, J. K., Kim, J. I., Choi, E. K., Carp, R. I., & Kim, Y. S. (2004). The cellular prion protein (PrPC) prevents apoptotic neuronal cell death and mitochondrial dysfunction induced by serum deprivation. *Brain Res Mol Brain Res*, 124(1), 40-50. <https://doi.org/10.1016/j.molbrainres.2004.02.005>
- Kim, Y. C., & Jeong, B. H. (2018). The first report of polymorphisms and genetic characteristics of the prion protein gene (PRNP) in horses. *Prion*, 12(3-4), 245-252. <https://doi.org/10.1080/19336896.2018.1513316>
- Kim, Y. C., Won, S. Y., Do, K., & Jeong, B. H. (2020). Identification of the novel polymorphisms and potential genetic features of the prion protein gene (PRNP) in horses, a prion disease-resistant animal. *Sci Rep*, 10(1), 8926. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-65731-5>
- Kimberlin, R. H., Cole, S., & Walker, C. A. (1987). Temporary and permanent modifications to a single strain of mouse scrapie on transmission to rats and hamsters. *J Gen Virol*, 68 (Pt 7), 1875-1881. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-68-7-1875>
- Kimberlin, R. H., & Walker, C. A. (1980). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for neural spread of infection to the CNS. *J Gen Virol*, 51(Pt 1), 183-187. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-1-183>
- Kimberlin, R. H., Walker, C. A., & Fraser, H. (1989). The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice. *J Gen Virol*, 70 (Pt 8), 2017-2025. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-8-2017>
- Kondratova, A. A., & Kondratov, R. V. (2012). The circadian clock and pathology of the ageing brain. *Nat. Rev. Neurosci*, 13(5), 325.
- Kong, Q., Zheng, M., Casalone, C., Qing, L., Huang, S., Chakraborty, B., Wang, P., Chen, F., Cali, I., & Corona, C. (2008). Evaluation of the human transmission risk of an atypical bovine spongiform encephalopathy prion strain. *Viol. J.*, 82(7), 3697-3701.
- Konold, T., Sivam, S., Ryan, J., Gubbins, S., Laven, R., & Howe, M. J. (2006). Analysis of clinical signs associated with bovine spongiform encephalopathy in casualty slaughter cattle. *Vet. J. VET J*, 171(3), 438-444.
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2008). Prion diseases: from protein to cell pathology. *Am J Pathol*, 172(3), 555-565. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070442>
- Kovacs, G. G., & Budka, H. (2009). Molecular pathology of human prion diseases. *Int J Mol Sci*, 10(3), 976-999. <https://doi.org/10.3390/ijms10030976>
- Kovacs, G. G., Head, M. W., Bunn, T., Laszlo, L., Will, R. G., & Ironside, J. W. (2000). Clinicopathological phenotype of codon 129 valine homozygote sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 26(5), 463-472. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2990.2000.00279.x>
- Kraus, A., Hoyt, F., Schwartz, C. L., Hansen, B., Hughson, A. G., Artikis, E., Race, B., & Caughey, B. (2021). Structure of an infectious mammalian prion. *BioRxiv*, 2021.2002.2014.431014.
- Kretzschmar, H. A., Neumann, M., & Stavrou, D. (1995). Codon 178 mutation of the human prion protein gene in a German family (Backer family): sequencing data from 72-year-old celloidin-embedded brain tissue. *Acta Neuropathol*, 89(1), 96-98. <https://doi.org/10.1007/BF00294264>

Referencias

- Kuznetsova, A., McKenzie, D., Banser, P., Siddique, T., & Aiken, J. M. (2014). Potential role of soil properties in the spread of CWD in western Canada. *Prion*, *8*(1), 92-99. <https://doi.org/10.4161/pri.28467>
- Lacroux, C., Perrin-Chauvineau, C., Corbière, F., Aron, N., Aguilar-Calvo, P., Torres, J. M., Costes, P., Brémaud, I., Lugan, S., & Schelcher, F. (2014). Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats. *Virology*, *88*(5), 2406-2413.
- Lacroux, C., Perrin-Chauvineau, C., Corbière, F., Aron, N., Aguilar-Calvo, P., Torres, J. M., Costes, P., Brémaud, I., Lugan, S., Schelcher, F., Barillet, F., & Andreoletti, O. (2014). Genetic resistance to scrapie infection in experimentally challenged goats. *J Virol*, *88*(5), 2406-2413. <https://doi.org/10.1128/JVI.02872-13>
- Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Mailliet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbière, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., & Andreoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, *4*(12), e1000238. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000238>
- Ladogana, A., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Jarius, C., Collins, S., Klug, G. M., Sutcliffe, T., Giulivi, A., Alperovitch, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J. P., Poser, S., Kretzschmar, H., Rietveld, I., Mitrova, E., Cuesta Jde, P., Martinez-Martin, P., Glatzel, M., Aguzzi, A., Knight, R., Ward, H., Pocchiari, M., van Duijn, C. M., Will, R. G., & Zerr, I. (2005). Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, *64*(9), 1586-1591. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000160117.56690.B2>
- Langeveld, J. P., Jacobs, J. G., Erkens, J. H., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., & van Keulen, L. J. (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res*, *2*, 19. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-19>
- Lauretti, E., Di Meo, A., Merali, S., & Praticò, D. (2017). Circadian rhythm dysfunction: a novel environmental risk factor for Parkinson's disease. *Mol. Psychiatry*, *22*(2), 280-286.
- Lee, Y. H., Sohn, H. J., Kim, M. J., Kim, H. J., Lee, W. Y., Yun, E. I., Tark, D. S., Cho, I. S., & Balachandran, A. (2013). Strain characterization of the Korean CWD cases in 2001 and 2004. *J Vet Med Sci*, *75*(1), 95-98. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0077>
- Legname, G., Baskakov, I. V., Nguyen, H. O., Riesner, D., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2004). Synthetic mammalian prions. *Science*, *305*(5684), 673-676. <https://doi.org/10.1126/science.1100195>
- Levavasseur, E., Privat, N., & Haik, S. (2019). In vitro Modeling of Prion Strain Tropism. *Viruses*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/v11030236>
- Lezmi, S., Bencsik, A., & Baron, T. (2001). CNA42 monoclonal antibody identifies FDC as PrPsc accumulating cells in the spleen of scrapie affected sheep. *Vet Immunol Immunopathol*, *82*(1-2), 1-8. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(01\)00323-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(01)00323-3)
- Liberski, P. P. (2012). Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol*, *50*(1), 1-12. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505359>
- Lim, A. S., Kowgier, M., Yu, L., Buchman, A. S., & Bennett, D. A. (2013). Sleep fragmentation and the risk of incident Alzheimer's disease and cognitive decline in older persons. *Sleep*, *36*(7), 1027-1032.
- Linden, R. (2017). The Biological Function of the Prion Protein: A Cell Surface Scaffold of Signaling Modules. *Front Mol Neurosci*, *10*, 77. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00077>
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I., & Brentani, R. R. (2008). Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, *88*(2), 673-728. <https://doi.org/10.1152/physrev.00007.2007>
- Llewelyn, C. A., Hewitt, P. E., Knight, R. S., Amar, K., Cousens, S., Mackenzie, J., & Will, R. G. (2004). Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet*, *363*(9407), 417-421. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)15486-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)15486-X)

Referencias

- Lugaresi, E., Medori, R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., & Gambetti, P. (1986). Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *N Engl J Med*, *315*(16), 997-1003. <https://doi.org/10.1056/NEJM198610163151605>
- M'Fadyean, J. (1918). Scrapie. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, *31*, 102-131.
- Mabbott, N. A. (2017). Immunology of Prion Protein and Prions. *Prog Mol Biol Transl Sci*, *150*, 203-240. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.06.004>
- Mabbott, N. A., & Bruce, M. E. (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*, *82*(Pt 10), 2307-2318. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2307>
- Maddison, B. C., Rees, H. C., Baker, C. A., Taema, M., Bellworthy, S. J., Thorne, L., Terry, L. A., & Gough, K. C. (2010). Prions are secreted into the oral cavity in sheep with preclinical scrapie. *J Infect Dis*, *201*(11), 1672-1676. <https://doi.org/10.1086/652457>
- Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2013). The evolution of transmissible prions: the role of deformed templating. *PLoS Pathog*, *9*(12), e1003759.
- Malhotra, R. K. (2018). Neurodegenerative disorders and sleep. *Sleep medicine clinics*, *13*(1), 63-70.
- Manka, S. W., Zhang, W., Wenborn, A., Betts, J., Joiner, S., Saibil, H. R., Collinge, J., & Wadsworth, J. D. (2022). 2.7 Å cryo-EM structure of ex vivo RML prion fibrils. *Nat. Commun*, *13*(1), 4004.
- Martins, V. R., & Brentani, R. R. (2002). The biology of the cellular prion protein. *Neurochem Int*, *41*(5), 353-355. [https://doi.org/10.1016/s0197-0186\(02\)00054-2](https://doi.org/10.1016/s0197-0186(02)00054-2)
- Masters, C. L., Harris, J. O., Gajdusek, D. C., Gibbs, C. J., Jr., Bernoulli, C., & Asher, D. M. (1979). Creutzfeldt-Jakob disease: patterns of worldwide occurrence and the significance of familial and sporadic clustering. *Ann Neurol*, *5*(2), 177-188. <https://doi.org/10.1002/ana.410050212>
- Mathiason, C. K., Powers, J. G., Dahmes, S. J., Osborn, D. A., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Hays, S. A., Hayes-Klug, J., Seelig, D. M., Wild, M. A., Wolfe, L. L., Spraker, T. R., Miller, M. W., Sigurdson, C. J., Telling, G. C., & Hoover, E. A. (2006). Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease. *Science*, *314*(5796), 133-136. <https://doi.org/10.1126/science.1132661>
- Mattis, J., & Sehgal, A. (2016). Circadian rhythms, sleep, and disorders of aging. *Trends Endocrinol*, *27*(4), 192-203.
- McGowan, J. (1922). Scrapie in sheep. *Scott J Agric*, *5*, 365-375.
- Meng, L. P., Zhao, D. M., Liu, H. X., Yang, J. M., Ning, Z. Y., Wu, C. D., & Han, C. X. (2005). Polymorphisms of the prion protein gene (PRNP) in Chinese domestic sika deer (*Cervus nippon hortulorum*). *Anim Genet*, *36*(3), 266-267. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01276.x>
- Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., & Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*, *54*(1), 63-74. <https://doi.org/10.1007/BF00691333>
- Miller, J. M., Jenny, A. L., Taylor, W. D., Marsh, R. F., Rubenstein, R., & Race, R. E. (1993). Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J. Vet. Diagn*, *5*(3), 309-316.
- Miller, M. W., Wild, M. A., & Williams, E. S. (1998). Epidemiology of chronic wasting disease in captive Rocky Mountain elk. *J Wildl Dis*, *34*(3), 532-538. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.3.532>
- Miller, M. W., & Williams, E. S. (2003). Prion disease: horizontal prion transmission in mule deer. *Nature*, *425*(6953), 35-36. <https://doi.org/10.1038/425035a>
- Monari, L., Chen, S. G., Brown, P., Parchi, P., Petersen, R. B., Mikol, J., Gray, F., Cortelli, P., Montagna, P., Ghetti, B., & et al. (1994). Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(7), 2839-2842. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.7.2839>

Referencias

- Monleon, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., Vargas, M. A., Badiola, J. J., & Acin, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Vet Microbiol*, 147(3-4), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.028>
- Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Bolea, R., Acin, C., Vargas, F., & Badiola, J. J. (2005). Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods*, 125(2), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.01.013>
- Monleón, E., Monzón, M., Hortells, P., Vargas, A., & Badiola, J. J. (2003). Detection of PrPsc in samples presenting a very advanced degree of autolysis (BSE liquid state) by immunocytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, 51(1), 15-18.
- Moore, R. A., Taubner, L. M., & Priola, S. A. (2009). Prion protein misfolding and disease. *Curr. Opin. Struct. Biol*, 19(1), 14-22.
- Moore, S. J., Vrentas, C. E., Hwang, S., West Greenlee, M. H., Nicholson, E. M., & Greenlee, J. J. (2018). Pathologic and biochemical characterization of PrP(Sc) from elk with PRNP polymorphisms at codon 132 after experimental infection with the chronic wasting disease agent. *BMC Vet Res*, 14(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1400-9>
- Morton, A. J., Wood, N. I., Hastings, M. H., Hurelbrink, C., Barker, R. A., & Maywood, E. S. (2005). Disintegration of the sleep-wake cycle and circadian timing in Huntington's disease. *J. Neurosci*, 25(1), 157-163.
- Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J., & La Bonnardiere, C. (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol*, 82(Pt 8), 2017-2024. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-2017>
- Musiek, E. S., Xiong, D. D., & Holtzman, D. M. (2015). Sleep, circadian rhythms, and the pathogenesis of Alzheimer disease. *Experimental & molecular medicine*, 47(3), e148.
- Ness, S. A. (2006). Basic microarray analysis: strategies for successful experiments. *Methods Mol Biol*, 316, 13-33. <https://doi.org/10.1385/1-59259-964-8:13>
- Nicholson, E. M., Brunelle, B. W., Richt, J. A., Kehrl, M. E., Jr., & Greenlee, J. J. (2008). Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: evidence of heritable BSE. *PLoS One*, 3(8), e2912. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002912>
- Nonno, R., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., D'Agostino, C., Vanni, I., Chiappini, B., Marcon, S., Riccardi, G., Tran, L., Vikoren, T., Vage, J., Madslie, K., Mitchell, G., Telling, G. C., Benestad, S. L., & Agrimi, U. (2020). Studies in bank voles reveal strain differences between chronic wasting disease prions from Norway and North America. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(49), 31417-31426. <https://doi.org/10.1073/pnas.2013237117>
- O'Rourke, K. I., Besser, T. E., Miller, M. W., Cline, T. F., Spraker, T. R., Jenny, A. L., Wild, M. A., Zebarth, G. L., & Williams, E. S. (1999). PrP genotypes of captive and free-ranging Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, 80 (Pt 10), 2765-2769. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2765>
- O'Rourke, K. I., Spraker, T. R., Hamburg, L. K., Besser, T. E., Brayton, K. A., & Knowles, D. P. (2004). Polymorphisms in the prion precursor functional gene but not the pseudogene are associated with susceptibility to chronic wasting disease in white-tailed deer. *J Gen Virol*, 85(Pt 5), 1339-1346. <https://doi.org/10.1099/vir.0.79785-0>
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., & et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40(4), 735-746. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90333-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90333-2)
- Okada, H., Miyazawa, K., Fukuda, S., Iwamaru, Y., Imamura, M., Masujin, K., Matsuura, Y., Fujii, T., Fujii, K., Kageyama, S., Yoshioka, M., Murayama, Y., & Yokoyama, T. (2014). The presence of disease-associated prion protein in skeletal muscle of cattle infected with classical bovine spongiform encephalopathy. *J Vet Med Sci*, 76(1), 103-107. <https://doi.org/10.1292/jvms.13-0363>

Referencias

- Ono, F., Tase, N., Kurosawa, A., Hiyaoka, A., Ohyama, A., Tezuka, Y., Wada, N., Sato, Y., Tobiume, M., Hagiwara, K., Yamakawa, Y., Terao, K., & Sata, T. (2011). Atypical L-type bovine spongiform encephalopathy (L-BSE) transmission to cynomolgus macaques, a non-human primate. *Jpn J Infect Dis*, 64(1), 81-84. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21266763>
- Osorio, R. S., Gumb, T., Pirraglia, E., Varga, A. W., Lu, S.-e., Lim, J., Wohlleber, M. E., Ducca, E. L., Koushyk, V., & Glodzik, L. (2015). Sleep-disordered breathing advances cognitive decline in the elderly. *Neurology*, 84(19), 1964-1971.
- Otto, M., Wiltfang, J., Cepek, L., Neumann, M., Mollenhauer, B., Steinacker, P., Ciesielczyk, B., Schulz-Schaeffer, W., Kretschmar, H., & Poser, S. (2002). Tau protein and 14-3-3 protein in the differential diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology*, 58(2), 192-197.
- Padilla, D., Beringue, V., Espinosa, J. C., Andreoletti, O., Jaumain, E., Reine, F., Herzog, L., Gutierrez-Adan, A., Pintado, B., Laude, H., & Torres, J. M. (2011). Sheep and goat BSE propagate more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice. *PLoS Pathog*, 7(3), e1001319. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001319>
- Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, 352(6333), 340-342. <https://doi.org/10.1038/352340a0>
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., & et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(23), 10962-10966. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10962>
- Papasavva-Stylianou, P., Kleantous, M., Toumazos, P., Mavrikiou, P., & Loucaides, P. (2007). Novel polymorphisms at codons 146 and 151 in the prion protein gene of Cyprus goats, and their association with natural scrapie. *Vet J*, 173(2), 459-462. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.09.013>
- Parchi, P., Castellani, R., Capellari, S., Ghetti, B., Young, K., Chen, S. G., Farlow, M., Dickson, D. W., Sima, A. A., Trojanowski, J. Q., Petersen, R. B., & Gambetti, P. (1996). Molecular basis of phenotypic variability in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*, 39(6), 767-778. <https://doi.org/10.1002/ana.410390613>
- Parchi, P., de Boni, L., Saverioni, D., Cohen, M. L., Ferrer, I., Gambetti, P., Gelpi, E., Giaccone, G., Hauw, J. J., Hofberger, R., Ironside, J. W., Jansen, C., Kovacs, G. G., Rozemuller, A., Seilhean, D., Tagliavini, F., Giese, A., & Kretschmar, H. A. (2012). Consensus classification of human prion disease histotypes allows reliable identification of molecular subtypes: an inter-rater study among surveillance centres in Europe and USA. *Acta Neuropathol*, 124(4), 517-529. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1002-8>
- Pattison, I. (1965). Experiments with scrapie with special reference to the nature of the agent and the pathology of the disease. *Slow, latent and temperate virus infections, NINDB Monograph*, 2, 249-257.
- Pattison, I. H., Gordon, W. S., & Millson, G. C. (1959). Experimental production of scrapie in goats. *J Comp Pathol*, 69, 300-312. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(59\)80029-1](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(59)80029-1)
- Pattison, I. H., & Jones, K. M. (1967). The possible nature of the transmissible agent of scrapie. *Vet Rec*, 80(1), 2-9. <https://doi.org/10.1136/vr.80.1.2>
- Pattison, I. H., & Millson, G. C. (1961). Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome. *J Comp Pathol*, 71, 101-109. [https://doi.org/10.1016/s0368-1742\(61\)80013-1](https://doi.org/10.1016/s0368-1742(61)80013-1)
- Peden, A. H., Head, M. W., Ritchie, D. L., Bell, J. E., & Ironside, J. W. (2004). Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient. *Lancet*, 364(9433), 527-529. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16811-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16811-6)
- Pelletto, S., Perucchini, M., Acin, C., Dalgleish, M. P., Reid, H. W., Rasero, R., Sacchi, P., Stewart, P., Caramelli, M., Ferroglio, E., Bozzetta, E., Meloni, D., Orusa, R., Robetto, S., Gennero,

Referencias

- S., Goldmann, W., & Acutis, P. L. (2009). Genetic variability of the prion protein gene (PRNP) in wild ruminants from Italy and Scotland. *J Vet Sci*, *10*(2), 115-120. <https://doi.org/10.4142/jvs.2009.10.2.115>
- Peralta, O. A., Huckle, W. R., & Eyestone, W. H. (2012). Developmental expression of the cellular prion protein (PrP(C)) in bovine embryos. *Mol Reprod Dev*, *79*(7), 488-498. <https://doi.org/10.1002/mrd.22057>
- Peretz, D., Scott, M. R., Groth, D., Williamson, R. A., Burton, D. R., Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (2001). Strain-specified relative conformational stability of the scrapie prion protein. *Protein Sci*, *10*(4), 854-863. <https://doi.org/10.1110/ps.39201>
- Peretz, D., Williamson, R. A., Legname, G., Matsunaga, Y., Vergara, J., Burton, D. R., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Scott, M. R. (2002). A change in the conformation of prions accompanies the emergence of a new prion strain. *Neuron*, *34*(6), 921-932. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00726-2](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00726-2)
- Perez, D. R., Damberger, F. F., & Wuthrich, K. (2010). Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol*, *400*(2), 121-128. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.066>
- Perucchini, M., Griffin, K., Miller, M. W., & Goldmann, W. (2008). PrP genotypes of free-ranging wapiti (*Cervus elaphus nelsoni*) with chronic wasting disease. *J Gen Virol*, *89*(Pt 5), 1324-1328. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83424-0>
- Pirisinu, L., Tran, L., Chiappini, B., Vanni, I., Di Bari, M. A., Vaccari, G., Vikoren, T., Madslie, K. I., Vage, J., Spraker, T., Mitchell, G., Balachandran, A., Baron, T., Casalone, C., Rolandsen, C. M., Roed, K. H., Agrimi, U., Nonno, R., & Benestad, S. L. (2018). Novel Type of Chronic Wasting Disease Detected in Moose (*Alces alces*), Norway. *Emerg Infect Dis*, *24*(12), 2210-2218. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180702>
- Polymenidou, M., Trusheim, H., Stallmach, L., Moos, R., Julius, C., Miele, G., Lenz-Bauer, C., & Aguzzi, A. (2008). Canine MDCK cell lines are refractory to infection with human and mouse prions. *Vaccine*, *26*(21), 2601-2614.
- Postuma, R. B., Gagnon, J.-F., & Montplaisir, J. (2013). Rapid eye movement sleep behavior disorder as a biomarker for neurodegeneration: the past 10 years. *Sleep Med*, *14*(8), 763-767.
- Premzl, M., Sangiorgio, L., Strumbo, B., Marshall Graves, J. A., Simonic, T., & Gready, J. E. (2003). Shadoo, a new protein highly conserved from fish to mammals and with similarity to prion protein. *Gene*, *314*, 89-102. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(03\)00707-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(03)00707-8)
- Priola, S. A. (1999). Prion protein and species barriers in the transmissible spongiform encephalopathies. *Biomed Pharmacother*, *53*(1), 27-33. [https://doi.org/10.1016/s0753-3322\(99\)80057-2](https://doi.org/10.1016/s0753-3322(99)80057-2)
- Provini, F., Vetrugno, R., Pierangeli, G., Cortelli, P., Rizzo, G., Filla, A., Strisciuglio, C., Gallassi, R., & Montagna, P. (2009). Sleep and temperature rhythms in two sisters with P102L Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) disease. *Sleep Med*, *10*(3), 374-377.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. <https://doi.org/10.1126/science.6801762>
- Prusiner, S. B. (1991). Molecular biology of prion diseases. *Science*, *252*(5012), 1515-1522. <https://doi.org/10.1126/science.1675487>
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13363-13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363>
- Prusiner, S. B., Bolton, D. C., Groth, D. F., Bowman, K. A., Cochran, S. P., & McKinley, M. P. (1982). Further purification and characterization of scrapie prions. *Biochemistry*, *21*(26), 6942-6950. <https://doi.org/10.1021/bi00269a050>
- Race, R., Oldstone, M., & Chesebro, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*, *74*(2), 828-833. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.828-833.2000>

Referencias

- Richardson, E. P., Jr., & Masters, C. L. (1995). The nosology of Creutzfeldt-Jakob disease and conditions related to the accumulation of PrPCJD in the nervous system. *Brain Pathol*, 5(1), 33-41. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00575.x>
- Rosenkranz, R., Borodina, T., Lehrach, H., & Himmelbauer, H. (2008). Characterizing the mouse ES cell transcriptome with Illumina sequencing. *Genomics*, 92(4), 187-194. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.05.011>
- Roucou, X., Gains, M., & LeBlanc, A. C. (2004). Neuroprotective functions of prion protein. *J Neurosci Res*, 75(2), 153-161. <https://doi.org/10.1002/jnr.10864>
- Rubenstein, R., Chang, B., Gray, P., Piltch, M., Bulgin, M. S., Sorensen-Melson, S., & Miller, M. W. (2011). Prion disease detection, PMCA kinetics, and IgG in urine from sheep naturally/experimentally infected with scrapie and deer with preclinical/clinical chronic wasting disease. *J Virol*, 85(17), 9031-9038. <https://doi.org/10.1128/JVI.05111-11>
- Ryder, S. J., Dexter, G. E., Heasman, L., Warner, R., & Moore, S. J. (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res*, 5, 9. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-9>
- Saborio, G. P., Permanne, B., & Soto, C. (2001). Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature*, 411(6839), 810-813. <https://doi.org/10.1038/35081095>
- Safar, J. G., Lessard, P., Tamguney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis*, 198(1), 81-89. <https://doi.org/10.1086/588193>
- Salazar, E., Monleon, E., Bolea, R., Acin, C., Perez, M., Alvarez, N., Leginagoikoa, I., Juste, R., Minguñon, E., Reina, R., Galaria, I., Berriatua, E., de Andres, D., Badiola, J. J., Amorena, B., & Lujan, L. (2010). Detection of PrPSc in lung and mammary gland is favored by the presence of Visna/maedi virus lesions in naturally coinfecting sheep. *Vet Res*, 41(5), 58. <https://doi.org/10.1051/vetres/2010030>
- Sanchez-Garcia, J., & Fernandez-Funez, P. (2018). D159 and S167 are protective residues in the prion protein from dog and horse, two prion-resistant animals. *Neurobiol Dis*, 119, 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.07.011>
- Scheckel, C., & Aguzzi, A. (2018). Prions, prionoids and protein misfolding disorders. *Nat. Rev. Genet*, 19(7), 405-418.
- Schrempf, W., Brandt, M. D., Storch, A., & Reichmann, H. (2014). Sleep disorders in Parkinson's disease. *J Parkinsons Dis*, 4(2), 211-221.
- Scott, M., Foster, D., Mirenda, C., Serban, D., Coufal, F., Walchli, M., Torchia, M., Groth, D., Carlson, G., DeArmond, S. J., Westaway, D., & Prusiner, S. B. (1989). Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques. *Cell*, 59(5), 847-857. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90608-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90608-9)
- Scott, M. R., Peretz, D., Nguyen, H. O., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2005). Transmission barriers for bovine, ovine, and human prions in transgenic mice. *J Virol*, 79(9), 5259-5271. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.9.5259-5271.2005>
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Nguyen, H. O., Tremblay, P., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1999). Compelling transgenic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(26), 15137-15142. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.26.15137>
- Serrano, C., Hammouchi, M., Benomar, A., Lyahyai, J., Ranera, B., Acin, C., el Hamidi, M., Monzon, M., Badiola, J. J., Tligui, N., Zaragoza, P., & Martin-Burriel, I. (2009). PRNP haplotype distribution in Moroccan goats. *Anim Genet*, 40(4), 565-568. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01873.x>
- Shin, H. Y., Oh, J. M., & Kim, Y. S. (2013). The Functional Role of Prion Protein (PrPC) on Autophagy. *Pathogens*, 2(3), 436-445. <https://doi.org/10.3390/pathogens2030436>
- Sigurdson, C. J. (2008). A prion disease of cervids: chronic wasting disease. *Vet Res*, 39(4), 41. <https://doi.org/10.1051/vetres:2008018>

Referencias

- Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 199-212. <https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.199>
- Silva, C. J., Vazquez-Fernandez, E., Onisko, B., & Requena, J. R. (2015). Proteinase K and the structure of PrP^{Sc}: The good, the bad and the ugly. *Virus Res*, *207*, 120-126. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.008>
- Simmons, M. M., Harris, P., Jeffrey, M., Meek, S. C., Blamire, I. W., & Wells, G. A. (1996). BSE in Great Britain: consistency of the neurohistopathological findings in two random annual samples of clinically suspect cases. *Vet Rec*, *138*(8), 175-177. <https://doi.org/10.1136/vr.138.8.175>
- Sisó, S., González, L., & Jeffrey, M. (2010). Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, *2010*.
- Siso, S., Jeffrey, M., Steele, P., McGovern, G., Martin, S., Finlayson, J., Chianini, F., & Gonzalez, L. (2008). Occurrence and cellular localization of PrP^d in kidneys of scrapie-affected sheep in the absence of inflammation. *J Pathol*, *215*(2), 126-134. <https://doi.org/10.1002/path.2336>
- Siso, S., Martin, S., Konold, T., Hawkins, S. A., Thurston, L., Simmons, M. M., Stack, M. J., Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2012). Minimal involvement of the circumventricular organs in the pathogenesis of spontaneously arising and experimentally induced classical bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol*, *147*(2-3), 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.01.008>
- Somerville, R. A., Chong, A., Mulqueen, O. U., Birkett, C. R., Wood, S. C., & Hope, J. (1997). Biochemical typing of scrapie strains. *Nature*, *386*(6625), 564. <https://doi.org/10.1038/386564a0>
- Soto, C., & Pritzkow, S. (2018). Protein misfolding, aggregation, and conformational strains in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci*, *21*(10), 1332-1340.
- Spagnolli, G., Rigoli, M., Novi Inverardi, G., Codeseira, Y. B., Biasini, E., & Requena, J. R. (2020). Modeling PrP^{Sc} generation through deformed templating. *Front. bioeng. biotechnol*, *8*, 590501.
- Sparkes, R. S., Simon, M., Cohn, V. H., Fournier, R. E., Lem, J., Klisak, I., Heinzmann, C., Blatt, C., Lucero, M., Mohandas, T., & et al. (1986). Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *83*(19), 7358-7362. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.19.7358>
- Spiropoulos, J., Lockey, R., Sallis, R. E., Terry, L. A., Thorne, L., Holder, T. M., Beck, K. E., & Simmons, M. M. (2011). Isolation of prion with BSE properties from farmed goat. *Emerg. Infect. Dis*, *17*(12), 2253.
- St Rose, S. G., Hunter, N., Matthews, L., Foster, J. D., Chase-Topping, M. E., Kruuk, L. E., Shaw, D. J., Rhind, S. M., Will, R. G., & Woolhouse, M. E. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis*, *6*, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-5>
- Stack, M. J., Moore, S. J., Vidal-Diez, A., Arnold, M. E., Jones, E. M., Spencer, Y. I., Webb, P., Spiropoulos, J., Powell, L., Bellerby, P., Thurston, L., Cooper, J., Chaplin, M. J., Davis, L. A., Everitt, S., Focosi-Snyman, R., Hawkins, S. A., Simmons, M. M., & Wells, G. A. (2011). Experimental bovine spongiform encephalopathy: detection of PrP(Sc) in the small intestine relative to exposure dose and age. *J Comp Pathol*, *145*(2-3), 289-301. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2011.01.010>
- Steele, A. D., Emsley, J. G., Ozdinler, P. H., Lindquist, S., & Macklis, J. D. (2006). Prion protein (PrP^c) positively regulates neural precursor proliferation during developmental and adult mammalian neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(9), 3416-3421. <https://doi.org/10.1073/pnas.0511290103>
- Steele, A. D., Jackson, W. S., King, O. D., & Lindquist, S. (2007). The power of automated high-resolution behavior analysis revealed by its application to mouse models of Huntington's and prion diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci*, *104*(6), 1983-1988.

Referencias

- Supattapone, S., Bosque, P., Muramoto, T., Wille, H., Aagaard, C., Peretz, D., Nguyen, H. O., Heinrich, C., Torchia, M., Safar, J., Cohen, F. E., DeArmond, S. J., Prusiner, S. B., & Scott, M. (1999). Prion protein of 106 residues creates an artificial transmission barrier for prion replication in transgenic mice. *Cell*, *96*(6), 869-878. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80596-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80596-6)
- Tamguney, G., Giles, K., Bouzamondo-Bernstein, E., Bosque, P. J., Miller, M. W., Safar, J., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2006). Transmission of elk and deer prions to transgenic mice. *J Virol*, *80*(18), 9104-9114. <https://doi.org/10.1128/JVI.00098-06>
- Tamguney, G., Miller, M. W., Wolfe, L. L., Sirochman, T. M., Glidden, D. V., Palmer, C., Lemus, A., DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2009). Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces. *Nature*, *461*(7263), 529-532. <https://doi.org/10.1038/nature08289>
- Tanner, C. M., Ottman, R., Goldman, S. M., Ellenberg, J., Chan, P., Mayeux, R., & Langston, J. W. (1999). Parkinson disease in twins: an etiologic study. *Jama*, *281*(4), 341-346.
- Terry, L. A., Howells, L., Bishop, K., Baker, C. A., Everest, S., Thorne, L., Maddison, B. C., & Gough, K. C. (2011). Detection of prions in the faeces of sheep naturally infected with classical scrapie. *Vet Res*, *42*, 65. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-65>
- Terry, L. A., Howells, L., Hawthorn, J., Edwards, J. C., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Simmons, H., Lizano, S., Estey, L., Leathers, V., & Everest, S. J. (2009). Detection of PrP^{Sc} in blood from sheep infected with the scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Virol*, *83*(23), 12552-12558. <https://doi.org/10.1128/JVI.00311-09>
- Terry, L. A., Marsh, S., Ryder, S. J., Hawkins, S. A., Wells, G. A., & Spencer, Y. I. (2003). Detection of disease-specific PrP in the distal ileum of cattle exposed orally to the agent of bovine spongiform encephalopathy. *Vet Rec*, *152*(13), 387-392. <https://doi.org/10.1136/vr.152.13.387>
- Thorne, L., & Terry, L. A. (2008). In vitro amplification of PrP^{Sc} derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie. *J Gen Virol*, *89*(Pt 12), 3177-3184. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/004226-0>
- Tobler, I., Gaus, S., Deboer, T., Achermann, P., Fischer, M., Rüllicke, T., Moser, M., Oesch, B., McBride, P., & Manson, J. (1996). Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature*, *380*(6575), 639.
- Torres, J. M., Espinosa, J. C., Aguilar-Calvo, P., Herva, M. E., Relano-Gines, A., Villa-Diaz, A., Morales, M., Parra, B., Alamillo, E., Brun, A., Castilla, J., Molina, S., Hawkins, S. A., & Andreoletti, O. (2014). Elements modulating the prion species barrier and its passage consequences. *PLoS One*, *9*(3), e89722. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089722>
- Toth, L. A., & Bhargava, P. (2013). Animal models of sleep disorders. *Comp. Med*, *63*(2), 91-104.
- Tranulis, M. A., Gavier-Widen, D., Vage, J., Noremark, M., Korpenfelt, S. L., Hautaniemi, M., Pirisinu, L., Nonno, R., & Benestad, S. L. (2021). Chronic wasting disease in Europe: new strains on the horizon. *Acta Vet Scand*, *63*(1), 48. <https://doi.org/10.1186/s13028-021-00606-x>
- Tremblay, P., Bouzamondo-Bernstein, E., Heinrich, C., Prusiner, S. B., & DeArmond, S. J. (2007). Developmental expression of PrP in the post-implantation embryo. *Brain Res*, *1139*, 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2006.12.055>
- Turnbaugh, J. A., Unterberger, U., Saá, P., Massignan, T., Fluharty, B. R., Bowman, F. P., Miller, M. B., Supattapone, S., Biasini, E., & Harris, D. A. (2012). The N-terminal, polybasic region of PrP^C dictates the efficiency of prion propagation by binding to PrP^{Sc}. *J. Neurosci*, *32*(26), 8817-8830.
- Vaccari, G., Panagiotidis, C. H., Acin, C., Peletto, S., Barillet, F., Acutis, P., Bossers, A., Langeveld, J., van Keulen, L., Sklaviadis, T., Badiola, J. J., Andreoletti, O., Groschup, M. H., Agrimi, U., Foster, J., & Goldmann, W. (2009). State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology. *Vet Res*, *40*(5), 48. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009031>

Referencias

- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Melen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E., & Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, *34*(5), 1228-1231. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1228-1231.1996>
- van Keulen, L. J., Vromans, M. E., & van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, *110*(1), 23-32. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.100104.x>
- Vargas, F., Lujan, L., Bolea, R., Monleon, E., Martin-Burriel, I., Fernandez, A., De Blas, I., & Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, *20*(1), 187-193. [https://doi.org/10.1892/0891-6640\(2006\)20\[187:daceos\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[187:daceos]2.0.co;2)
- Vascellari, M., Nonno, R., Mutinelli, F., Bigolaro, M., Di Bari, M. A., Melchiotti, E., Marcon, S., D'Agostino, C., Vaccari, G., Conte, M., De Grossi, L., Rosone, F., Giordani, F., & Agrimi, U. (2007). PrPSc in salivary glands of scrapie-affected sheep. *J Virol*, *81*(9), 4872-4876. <https://doi.org/10.1128/JVI.02148-06>
- Vidal, E., Fernández-Borges, N., Pintado, B., Ordóñez, M., Márquez, M., Fondevila, D., Torres, J. M., Pumarola, M., & Castilla, J. (2013). Bovine spongiform encephalopathy induces misfolding of alleged prion-resistant species cellular prion protein without altering its pathobiological features. *J. Neurosci*, *33*(18), 7778-7786.
- Wadsworth, J. D., Asante, E. A., Desbruslais, M., Linehan, J. M., Joiner, S., Gowland, I., Welch, J., Stone, L., Lloyd, S. E., Hill, A. F., Brandner, S., & Collinge, J. (2004). Human prion protein with valine 129 prevents expression of variant CJD phenotype. *Science*, *306*(5702), 1793-1796. <https://doi.org/10.1126/science.1103932>
- Wang, B., Lou, Z., Zhang, H., & Xu, B. (2016). Effect of the electrostatic surface potential on the oligomerization of full-length human recombinant prion protein at single-molecule level. *Chem. Phys*, *144*(11), 114701.
- Watts, J. C., & Westaway, D. (2007). The prion protein family: diversity, rivalry, and dysfunction. *Biochim Biophys Acta*, *1772*(6), 654-672. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2007.05.001>
- Weissova, K., Bartoš, A., Sládek, M., Novakova, M., & Sumová, A. (2016). Moderate changes in the circadian system of Alzheimer's disease patients detected in their home environment. *PLoS One*, *11*(1), e0146200.
- Wells, G. A., Hancock, R. D., Cooley, W. A., Richards, M. S., Higgins, R. J., & David, G. P. (1989). Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec*, *125*(21), 521-524. <https://doi.org/10.1136/vr.125.21.521>
- Wells, G. A., & McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, *53*(1), 1-10. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(92\)90076-e](https://doi.org/10.1016/0034-5288(92)90076-e)
- Wells, G. A., Scott, A. C., Johnson, C. T., Gunning, R. F., Hancock, R. D., Jeffrey, M., Dawson, M., & Bradley, R. (1987). A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec*, *121*(18), 419-420. <https://doi.org/10.1136/vr.121.18.419>
- Wells, G. A., Spiropoulos, J., Hawkins, S. A., & Ryder, S. J. (2005). Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet Rec*, *156*(13), 401-407. <https://doi.org/10.1136/vr.156.13.401>
- Wells, G. A., & Wilesmith, J. W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*, *5*(1), 91-103. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.1995.tb00580.x>
- Westaway, D., Goodman, P. A., Mirenda, C. A., McKinley, M. P., Carlson, G. A., & Prusiner, S. B. (1987). Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice. *Cell*, *51*(4), 651-662. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90134-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90134-6)

Referencias

- White, S. N., Spraker, T. R., Reynolds, J. O., & O'Rourke, K. I. (2010). Association analysis of PRNP gene region with chronic wasting disease in Rocky Mountain elk. *BMC Res Notes*, 3, 314. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-314>
- Wilesmith, J. W., Ryan, J. B., & Atkinson, M. J. (1991). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies on the origin. *Vet Rec*, 128(9), 199-203. <https://doi.org/10.1136/vr.128.9.199>
- Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, 123(25), 638-644. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3218047>
- Wilhelm, B. T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C. J., Rogers, J., & Bahler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*, 453(7199), 1239-1243. <https://doi.org/10.1038/nature07002>
- Will, R. G., Cousens, S. N., Farrington, C. P., Smith, P. G., Knight, R. S., & Ironside, J. W. (1999). Deaths from variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, 353(9157), 979. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(99\)01160-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(99)01160-5)
- Will, R. G., & Ironside, J. W. (2017). Sporadic and Infectious Human Prion Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 7(1). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024364>
- Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, 347(9006), 921-925. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(96\)91412-9](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)91412-9)
- Williams, E. (2005). Chronic wasting disease. *Vet. Pathol*, 42(5), 530-549.
- Williams, E. S. (2005). Chronic wasting disease. *Vet Pathol*, 42(5), 530-549. <https://doi.org/10.1354/vp.42-5-530>
- Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, 16(1), 89-98. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.1.89>
- Wilson, R., Plinston, C., Hunter, N., Casalone, C., Corona, C., Tagliavini, F., Suardi, S., Ruggerone, M., Moda, F., Graziano, S., Sbriccoli, M., Cardone, F., Pocchiari, M., Ingrosso, L., Baron, T., Richt, J., Andreoletti, O., Simmons, M., Lockey, R., Manson, J. C., & Barron, R. M. (2012). Chronic wasting disease and atypical forms of bovine spongiform encephalopathy and scrapie are not transmissible to mice expressing wild-type levels of human prion protein. *J Gen Virol*, 93(Pt 7), 1624-1629. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042507-0>
- Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., & Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, 140(7), 167-174. <https://doi.org/10.1136/vr.140.7.167>
- Wopfner, F., Weidenhofer, G., Schneider, R., von Brunn, A., Gilch, S., Schwarz, T. F., Werner, T., & Schatzl, H. M. (1999). Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein. *J Mol Biol*, 289(5), 1163-1178. <https://doi.org/10.1006/jmbi.1999.2831>
- Wrathall, A. E., Brown, K. F., Sayers, A. R., Wells, G. A., Simmons, M. M., Farrelly, S. S., Bellerby, P., Squirrell, J., Spencer, Y. I., Wells, M., Stack, M. J., Bastiman, B., Pullar, D., Scatcherd, J., Heasman, L., Parker, J., Hannam, D. A., Helliwell, D. W., Chree, A., & Fraser, H. (2002). Studies of embryo transfer from cattle clinically affected by bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Vet Rec*, 150(12), 365-378. <https://doi.org/10.1136/vr.150.12.365>
- Wroe, S. J., Pal, S., Siddique, D., Hyare, H., Macfarlane, R., Joiner, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Hewitt, P., & Collinge, J. (2006). Clinical presentation and pre-mortem diagnosis of variant Creutzfeldt-Jakob disease associated with blood transfusion: a case report. *Lancet*, 368(9552), 2061-2067. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69835-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69835-8)

Referencias

- Zhang, J. (2011). The structural stability of wild-type horse prion protein. *J Biomol Struct Dyn*, 29(2), 369-377. <https://doi.org/10.1080/07391102.2011.10507391>
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*, 66(2 Suppl 1), S102-109. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000192306.98198.ec>
- Zhang, L., Li, N., Fan, B., Fang, M., & Xu, W. (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim Genet*, 35(6), 457-461. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01204.x>
- Zigas, V., & Gajdusek, D. C. (1957). Kuru: clinical study of a new syndrome resembling paralysis agitans in natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Med J Aust*, 44(21), 745-754. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1957.tb60287.x>

