

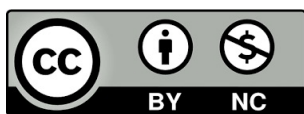
Jenny Lozada Ortiz

Identificación de biomarcadores asociados con el estrés del retículo endoplásmico y el bloqueo del sistema ubiquitina-proteasoma en las enfermedades priónicas

Director/es

Badiola, Juan José
Otero García, Alicia

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



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES
ASOCIADOS CON EL ESTRÉS DEL RETÍCULO
ENDOPLÁSMICO Y EL BLOQUEO DEL SISTEMA
UBIQUITINA-PROTEASOMA EN LAS
ENFERMEDADES PRIÓNICAS

Autor

Jenny Lozada Ortiz

Director/es

Badiola, Juan José
Otero García, Alicia

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

2024



**Universidad
Zaragoza**

Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes

Departamento de Patología Animal

Facultad de Veterinaria

**CONTRIBUCIONES AL ESTUDIO DE BIOMARCADORES
ASOCIADOS CON EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y
EL BLOQUEO DEL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA EN LAS
ENFERMEDADES PRIÓNICAS**

Memoria de tesis presentada por la graduada

Jenny Lozada Ortiz

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Directores:

Dr. Juan José Badiola Díez

Dra. Alicia Otero

Zaragoza, diciembre 2023



Departamento de
Patología Animal
Universidad Zaragoza



Centro de Encefalopatías y
Enfermedades Transmisibles
Emergentes
Universidad Zaragoza

D. JUAN JOSÉ BADIOLA DÍEZ, Director Honorífico 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 y **DÑA ALICIA OTERO GARCÍA**, Profesora Ayudante Doctor del Departamento de Patología Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza.

INFORMAN:

Que Dña. Jenny Lozada Ortiz ha realizado, bajo nuestra dirección, los trabajos correspondientes a su Tesis Doctoral titulada **“IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES ASOCIADOS CON EL ESTRÉS DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO Y EL BLOQUEO DEL SISTEMA UBIQUITINA-PROTEASOMA EN 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 24 de noviembre de 2023.

Fdo: Juan José Badiola Díez

Fdo: Alicia Otero García

A mi madre que está en el cielo

"Thank you for taking me this far"

AGRADECIMIENTOS

Ha sido un largo recorrido para llegar a escribir las últimas líneas de este trabajo, y es que, este apartado me llena de nostalgia, pero es aquí donde puedo plasmar un agradecimiento profundo a quienes han contribuido en la realización de esta meta.

A mi padre Vicente por su apoyo incondicional, a mi hermana Sandra por empujarme a conseguir este sueño y cuidar de mi padre, a toda mi familia y amigos por ser el pilar fundamental en mi vida y el apoyo emocional que he necesitado para poder vivir fuera de casa.

Dicen que la vida pone en tu camino a las personas que necesitas en tu vida, en mi caso una plática en León con el Dr. Juan José Badiola me motivó a encaminarme en este recorrido. Gracias Dr. Juan por la dirección de tesis y por abrirme las puertas de tan prestigioso centro de investigación.

A Alicia, sin la dirección de tan excelente y experta profesional en este campo no hubiera sido posible el desarrollo de este trabajo, sus consejos profesionales y su apoyo cuando lo he necesitado me han empujado poco a poco a lograr los objetivos trazados. Espero estés orgullosa de tu tesista, porque cuando tenía momentos de desánimo, tu seguías confiando en mí trabajo.

Gracias también a todas las personas que me han acompañado en esta aventura de una u otra manera. A Rosa, Cristina, Belén, Nico gracias por compartir sus conocimientos y brindarme esa mano amiga siempre que la he requerido.

Sandra y Dani, gracias por la ayuda brindada en el laboratorio y por esas palabras de aliento. A África, gracias por la gestión en todo lo que he necesitado para el desarrollo de esta tesis.

Gracias a mis compañeros de doctorado Mirta, Marina, Diego con quienes di mis primeros pasos en el laboratorio, gracias por sus enseñanzas y por su paciencia. Aquí debo hacer una pausa y agradecer con mucho cariño a Sonia, mi compañera de primer año de doctorado con quien he trabajado muy de cerca y siempre estuvo presta para brindarme una mano en lo que he necesitado.

Gracias a todos por el tiempo compartido, por las risas, los abrazos, los cafés. Espero haber sembrado una amistad muy bonita que perdure con el tiempo, me siento feliz por el trabajo realizado y porque estuve rodeada de los mejores.

A mis amigos becarios “Santander”, con quienes compartí largas pláticas, gracias por los platos típicos, los viajes, las aventuras, risas y llantos.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida profesional y personal, algunas están aquí conmigo y otras en mis recuerdos, gracias por su apoyo incondicional, sus consejos, sus palabras de aliento. Gracias infinitas a todos por acompañarme en este viaje, les guardo en mi corazón.

Jenny Lozada Ortiz

Lista de abreviaturas

A

ADN	ácido desoxirribonucleico
ATF4	factor de transcripción activador 4
ATF6	factor de transcripción activador 6

B

BiP/ GRP78	proteína de unión a Inmunoglobulina
BG	ganglios basales
BGc	corteza a nivel de los ganglios basales
BSE	encefalopatía espongiforme bovina

C

Cb	cerebelo
CHOP	proteína homóloga al factor de transcripción
CWD	caquexia crónica de los Cérvidos

D

DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DMNX	núcleo motor dorsal del vago

E

ECJ	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ)
ECJi	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica
<i>EIF2AK3</i>	gen que codifica a la proteína PERK
EEF	encefalopatía espongiforme Felina
EETs	encefalopatías espongiformes transmisibles
ERAD	vía de degradación asociada al retículo endoplásmico
eIF2α	factor 2 α de iniciación de la traslación eucariótica fosforilado
ELISA	ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas
ETV	enfermedad transmisible del Vison

F

fECJ	enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar
Fc	corteza frontal

G

GFP proteína verde fluorescente

GSS Gerstmann–Sträussler–Scheinker

H

Hc hipocampo

HSPA5 gen que codifica la proteína BiP

Ht hipotálamo

I

IHQ inmunohistoquímica

IFF insomnio familiar fatal

ISF insomnio esporádico fatal

IRE1 α quinasa transmembrana que requiere inositol

K

kDa kilodaltons

M

Mo médula oblongada

P

Pc corteza parietal

PCR reacción en cadena de la polimerasa

PERK quinasa del retículo

Endoplásmico

PDI proteína disulfuro-isomerasa

PDIA1 proteína disulfuro-isomerasa A1

PDIA3 proteína disulfuro-isomerasa A3

PMCA amplificación cíclica de proteínas mal plegadas

PrP^{res} PrP resistente a la digestión con proteasa

PRNP gen que codifica la proteína Prion

PrP^{Sc} proteína prion patológica

PrP^C proteína prion celular

P4HB gen que codifica la proteína PDI

PK proteinasa K

R

RE retículo endoplásmico

S

Sc médula espinal

sCJD enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica

SNC sistema nervioso central

T

T tálamo

U

UbG76V –GFP Ubiquitina marcada con GFP

UPS sistema ubiquitina-
proteasoma

UPR respuesta a proteínas
desplegadas

V

VPSPr prionopatía de sensibilidad
variable a la proteasa

W

WB western blot

μl. Microlitro	g. Gramo
μg. Microgramo	mg. Miligramo
h. Hora	ml. Mililitro
°C. Grado centígrado	M. Molar
mM. Milimolar	s. Segundo

Aminoácidos

A: Alanina	H: Histidina	N: Asparagina	T: Treonina
C: Cisteína	I: Isoleucina	P: Prolina	V: Valina
E: Ácido glutámico	K: Lisina	Q: Glutamina	Y: Tirosina
F: Fenilalanina	L: Leucina	R: Arginina	W: Triptófano
G: Glicina	M: Metionina	S: Serina	

Índice general

Antecedentes y Objetivos	1
Antecedentes.....	1
Objetivos.....	3
Revisión Bibliográfica.....	5
1. Introducción	7
2. Etiología	10
2.1. Scrapie clásico.....	14
2.2. Scrapie atípico	15
2.3. Factores genéticos	15
3. Patogenia	17
4. Signos clínicos.....	20
5. Diagnóstico.....	21
6. Neurodegeneración en las enfermedades priónicas.....	26
7. Estrés del Retículo endoplásmico (RE).....	27
8. Respuesta a proteínas desplegadas	28
8.1. Quinasa del retículo endoplásmico (PERK)	29
8.2. Proteína de unión a inmunoglobulina (BiP).....	31
8.3. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)	32
8.4. El sistema ubiquitina proteasoma (UPS).....	35
9. Metodología.....	39
9.1. Animales y muestreo.....	41
9.2. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos	42

9.3. Evaluación y cuantificación	45
9.4. Análisis de la expresión génica	46
10. Resultados.....	49
10.1 Quinasa del retículo endoplásmico (PERK).....	51
10.2 Proteína inmunoglobulina de unión (BiP).....	55
10.3 Proteína disulfuro isomerasa (PDI)	59
10.4 Ubiquitina.....	64
11. Discusión.....	73
12. Conclusiones.....	87
13. Resumen.....	93
14. Abstract.....	101
15. Anexo.....	108
16. Bibliografía.....	122

Índice figuras

Revisión bibliográfica

Figura 1. Estructura de la PrP ^C y PrP ^{Sc}	11
Figura 2. Respuesta a proteínas desplegadas.....	34
Figura 3. Deterioro del sistema ubiquitina-proteasoma.....	38

Resultados

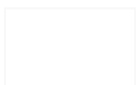
Figura 4. Expresión de la quinasa del retículo endoplásmico (PERK) en el encéfalo de ovejas infectadas con scrapie clínico, preclínico y en ovejas sanas.	52
Figura 5. Niveles de expresión de la proteína PERK	53
Figura 6. Expresión génica de EIF2AK3 en la corteza frontal, tálamo, hipocampo y médula oblongada de ovejas clínicas, preclínicas y controles sanos.	54
Figura 7. Expresión de la proteína inmunoglobulina de unión (BiP) en ovejas infectadas con scrapie clínico, preclínico y ovejas sanas (control).	56
Figura 8. Niveles de expresión de BiP en ocho animales clínicos, cinco preclínicos y ocho controles evaluados mediante el siguiente sistema de puntuación semicuantitativo.....	57
Figura 9. Perfiles de expresión de ARNm del gen HSPA5 en corteza frontal, tálamo, hipocampo y médula oblongada de ovejas clínicas, preclínicas y control.	58

Figura 10. Expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) en ovejas infectadas con scrapie clínico y preclínico y ovejas control sanas.....	60
Figura 11. Agregados granulares de la proteína disulfuro isomerasa (PDI).	61
Figura 12. Expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI).	62
Figura 13. Expresión génica de P4HB en corteza frontal, tálamo, hipocampo y medula oblongada de ovejas clínicas, preclínicas y de control.	
Figura 14. Acumulación de ubiquitina en ovejas infectadas con scrapie clínico y preclínico y en ovejas sanas.	65
Figura 15. Los niveles de expresión de la proteína ubiquitina en ocho animales clínicos, cinco preclínicos y ocho controles sanos se evaluaron semicuantitativamente.....	66
Figura 16. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina en el tálamo de ovejas clínicas, preclínicas y sanas.....	67
Figura 17. Valores promedio de la valoración semicuantitativa de la presencia de lesiones espongiformes en cada área del encéfalo	68
Figura 18. Depósitos de PrP ^{Sc} en las ovejas clínicas y preclínicas.....	68
Figura 19. Valores promedio de la valoración semicuantitativa de la presencia de depósitos de PrP ^{Sc} en cada área del encéfalo	69

Índice de tablas

Tabla 1. Enfermedades priónicas animales y humanas	9
Tabla 2. Genotipos ovinos y susceptibilidad a desarrollar scrapie clásico (Dawson et al., 1998).....	17
Tabla 3. Protocolos inmunohistoquímicos utilizados para la detección de marcadores de estrés de RE.	44
Tabla 4. Primers utilizados para el estudio genómico	47
Tabla 5. Valores de correlación de Spearman entre las puntuaciones de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico (RE) y deterioro del proteasoma y las lesiones histopatológicas asociadas a priones.	70

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS



Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), o enfermedades priónicas, son enfermedades neurodegenerativas que afectan tanto a los animales como al hombre, siendo el scrapie el modelo prototipo de este grupo de enfermedades (Whitechurch et al., 2017). Las EETs se caracterizan por la acumulación en el sistema nervioso central (SNC) de la proteína PrP^{Sc} , una isoforma anormal de una glicoproteína de membrana fisiológica denominada PrP^{C} (Prusiner, 1998). Se ha demostrado que la PrP^{C} tiene un alto contenido de α -hélice (42%) y bajo contenido en hojas plegadas β (3%), dado el hecho de la conversión, la PrP^{C} sufre cambios que implican que la α -hélice disminuya mientras aumentan las hojas plegadas β (Pan et al., 1993, Manka et al., 2022).

Dado que la PrP^{Sc} parece ser el único componente de la partícula priónica “infecciosa”, está aceptado que esta transición conformacional es un evento fundamental en la propagación de los priones (Prusiner, 1982). La acumulación de esta proteína en el SNC provoca una degeneración espongiforme en el neuropilo acompañado de gliosis, vacuolización y muerte neuronal (Fraser, 1993).

Los factores que determinan los mecanismos patogénicos causados por la PrP^{Sc} aún no se conocen con exactitud, sin embargo, algunos hallazgos apuntan a que la homeostasis del retículo endoplásmico (RE) se ve alterada en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas inducido por la PrP^{Sc} lo cual podría jugar un papel muy importante en la neurodegeneración asociada a estas

enfermedades (Hetz, 2012). Como respuesta al estrés del RE se desarrolla la respuesta a las proteínas desplegadas (UPR) (Hetz et al., 2011, Hetz, et al., 2012). Si la proteína se pliega incorrectamente se lleva a cabo una sobreexpresión de chaperonas que ayudan al plegamiento correcto de proteínas. La principal chaperona en contribuir en este evento es la proteína de unión a inmunoglobulina BiP (Hampton, 2002, Mays and Soto, 2016). También participa la quinasa del retículo endoplásmico (PERK) como una de las principales proteínas sensoras que detectan fallos en el plegamiento de las proteínas. Cuando no se detectan mecanismos de estrés, estas proteínas se encuentran unidas a la proteína de unión a inmunoglobulina BiP y permanecen inactivas, mientras que, en respuesta al estrés producido por la acumulación de proteínas malplegadas, PERK se disocia de BiP y luego activa las proteínas sensoras que desencadenan la conocida como “respuesta de proteínas desplegadas” o UPR, del inglés *unfolded protein response* (Carraca et al., 2015; Wang et al., 2018). También acompañan al control de calidad las enzimas disulfuro isomerasas (PDI) que contribuyen al plegado correcto de las proteínas y a la reorganización de los puentes disulfuro (Wang et al., 2015; Turano et al., 2002). Todavía no se conoce con exactitud el mecanismo de activación de estos eventos. Sin embargo, lo que se sí se sabe es que, de no llevarse a cabo un control sistemático en el correcto plegamiento de las proteínas y si la UPR no puede controlar la homeostasis en el RE, existen dos mecanismos de degradación proteica, una de ellas es el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS) y por otro lado la muerte celular por apoptosis (Berke et al., 2003).

El UPS juega un papel importante en la eliminación de proteínas mal plegadas como mecanismo vital para favorecer la homeostasis celular (Berke et al., 2003). Algunos estudios han demostrado que los niveles de la proteína ubiquitina pueden verse incrementados como resultado de la resistencia a la proteasa de la PrP^{Sc} (Kang et al., 2004). Otros resultados sugieren que los fenómenos neuropatológicos y neuroinflamatorios que se desarrollan en las enfermedades priónicas están relacionados con la acumulación de las proteínas PERK, BiP, PDI y ubiquitina (Otero et al., 2021). Sin embargo, aún no se han podido determinar con exactitud los mecanismos moleculares que relacionan a la enfermedad priónica con la neurodegeneración ni cuál es el papel del estrés del RE o del bloqueo del UPS.

Así, el objetivo general de esta tesis es determinar si durante el curso del desarrollo del scrapie natural se produce el estrés del RE o un bloqueo de la función del UPS utilizando muestras de encéfalo procedentes de ovinos afectados por scrapie natural.

Para conseguir este objetivo general, se han establecido los siguientes objetivos específicos:

- Determinar mediante un estudio inmunohistoquímico la acumulación de las proteínas cinasa del retículo endoplásmico (PERK), la proteína de unión a inmunoglobulina (BiP) y la proteína disulfuro isomerasa (PDI) como marcadores del estrés del retículo endoplásmico, ya que parecen estar

relacionados con los cambios neuropatológicos en las enfermedades priónicas, encontrándose sobreexpresadas en modelos murinos que desarrollaron una enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021).

- Evaluar mediante una técnica inmunohistoquímica la acumulación de agregados de ubiquitina para determinar el papel que juega el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) durante el curso natural de las enfermedades priónicas. El UPS en condiciones normales es el encargado del marcaje y degradación de proteínas lesionadas o mal plegadas, sin embargo, se ha descrito que en las enfermedades priónicas este sistema se puede ver alterado debido a la sobresaturación del UPS por intentar mantener la homeostasis en el retículo endoplásmico entre la síntesis y degradación proteica.
- Validar mediante la PCR cuantitativa los potenciales biomarcadores génicos implicados en el estrés del retículo endoplásmico, los genes *EIF2AK3*, *HSPA5* y *P4HB*, que codifican respectivamente las proteínas PERK, BiP y PDI.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Introducción

Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

Las encefalopatías espongiformes transmisibles o enfermedades priónicas son un grupo importante de enfermedades neurodegenerativas letales que afecta a humanos y animales y que se caracterizan por el acumulo de priones en el sistema nervioso central (SNC). Los priones son isoformas anómalas de la proteína prionica celular (PrP^C) la cual se convierte en la proteína prion patológica o PrP^{Sc}, capaz de conducir a la muerte neuronal y provocar lesiones de tipo vacuolar en el cerebro, lo que le atribuye el aspecto “espongiforme”, sello característico y por el que toma nombre este grupo de enfermedades (Prusiner, 1998). En el hombre se han descrito, entre otras, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ), el insomnio familiar fatal, la enfermedad de Gerstmann–Sträussler–Scheinker (GSS) y el kuru. Las enfermedades priónicas animales incluyen la encefalopatía espongiforme bovina (BSE), la caquexia crónica de los cérvidos (CWD), la encefalopatía espongiforme felina (EEF), la enfermedad transmisible del visón (ETV) y el scrapie en el ganado ovino y caprino, entre otras. El descubrimiento de la EEB sucedió en 1987 (Wells et al., 1987). La hipótesis más aceptada acerca de la aparición de esta enfermedad fue la infección del ganado bovino por el agente del scrapie el cual estaba presente en alimentos para ganado que contenían proteínas derivadas de rumiantes (Wilesmith et al., 1988). Años

más tarde, la EEB cobró gran importancia cuando se asoció con el origen de la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) en humanos (Bruce et al., 1997). Este hecho confirmó que los priones pueden atravesar barreras inter-especies y que algunos de ellos tienen propiedades zoonóticas. La EEB representó un riesgo para la salud pública, por lo que fue necesario establecer un sistema de vigilancia epidemiológica, detección y erradicación de la enfermedad. El scrapie ovino y caprino fue descrito hace más de 300 años y actualmente está presente en los estados miembros de la Unión Europea, Asia y en América del Norte y Sudamérica (Mitchell et al., 2010, Leal et al., 2015), así como en Nueva Zelanda (Brash, 1952) y Australia (Cook et al., 2016). Esta enfermedad se descubrió por primera vez en Europa y generó grandes pérdidas económicas (Mcgowan, 1922). No existe evidencia de transmisión del scrapie al ser humano en condiciones naturales, si bien se ha sugerido que ciertas cepas de scrapie pueden transmitirse a modelos murinos humanizados (Cassard et al., 2014). Esta enfermedad está considerada el prototipo para el estudio de las EETs. El campo de la investigación en estas enfermedades es amplio, por lo que es importante conocer más en profundidad los mecanismos moleculares implicados en estos procesos patológicos a lo que este trabajo puede aportar algunos datos de interés.

Tabla 1. Enfermedades priónicas animales y humanas (Acin et al., 2021)

Animales			
Enfermedad	Hospedador natural	Origen	Año de la descripción
Scrapie clásico	Oveja, cabra, muflón	Infeccioso	1732
Scrapie atípico	Ovejas y cabras	Esporádico	1998
Encefalopatía espongiforme bovina	Bovino	Infeccioso	1986
Enfermedad debilitante crónica	Ciervo, wapití, reno, alce	Infeccioso	1967
Encefalopatía espongiforme felina	Felinos	Infeccioso	1990
Encefalopatía transmisible del visón	Visón	Infeccioso	1947
Encefalopatía de ungulados exóticos	Antílope	Infeccioso	1986
EET en primates no humanos	Lémur	Infeccioso	1996
Enfermedad priónica de los camélidos	Dromedarios	Infeccioso	2018
Humanos			
Enfermedad	Hospedador natural	Origen	Año de la descripción
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD)	Humano	Esponáneo	1920
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (fECJ)	Humano	Hereditario	1924
Kuru	Humano	Infeccioso	1953
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (ECJi)	Humano	Infeccioso	1974
Insomnio Familiar Fatal	Humano	Hereditario	1986

(IFF)			
Insomnio esporádico fatal (ISF)	Humano	Espontáneo	1999
Prionopatía de sensibilidad variable a la proteasa (VPSPr)	Humano	Espontáneo	2008

2. Etiología

Tras la descripción del Scrapie en la oveja en 1732, la extraña naturaleza del agente causal llevó a la comunidad científica a plantearse varias hipótesis sobre la etiología de la enfermedad. Tras varias décadas de estudio, la teoría de “solo proteína” enunciada por Griffith fue la propuesta mayoritariamente aceptada (Griffith, 1967). Sin duda, estos hallazgos generaron controversia y disputas científicas ya que resultaba difícil entender la capacidad de un patógeno que carecía de material genético para causar enfermedad. Dada la capacidad del agente infeccioso para resistir a tratamientos que modifican los ácidos nucleicos se sospechó que carecía de material genético. Más adelante, se logró demostrar que el agente del scrapie contenía una proteína que por sí misma, producía infectividad y era capaz de transmitir la enfermedad (Prusiner 1981). Y fue precisamente, el científico Stanley B. Prusiner, quien propuso el término “prion” (*proteinaceous infectious particle*) para designar a esas pequeñas partículas infecciosas de origen proteico (Prusiner, 1982). Ésta es la teoría actualmente aceptada, que establece que la proteína priónica celular PrP^C sufre un cambio conformacional a una isoforma anormal, la isoforma patógena PrP^{Sc} (Prusiner,

1991). Así pues, la PrP^{Sc} es el único componente de la partícula priónica "infecciosa" estableciéndose así como el agente causal de las EETs. La secuenciación de una fracción proteica de la PrP 27-30, extraída de cerebros infectados con scrapie, permitió identificar al gen codificante para la proteína, el gen *PRNP*. Para sorpresa de la comunidad científica ésta se hallaba en el genoma del hospedador (Oesch et al., 1985). La PrP^{C} y PrP^{Sc} son la misma proteína, pero con distinta conformación. La PrP^{C} tiene un alto contenido de α -hélice (42%) y un (3%) de láminas β y por el contrario, la PrP^{Sc} está compuesta principalmente por láminas β (Figura 1) (Manka et al., 2022).

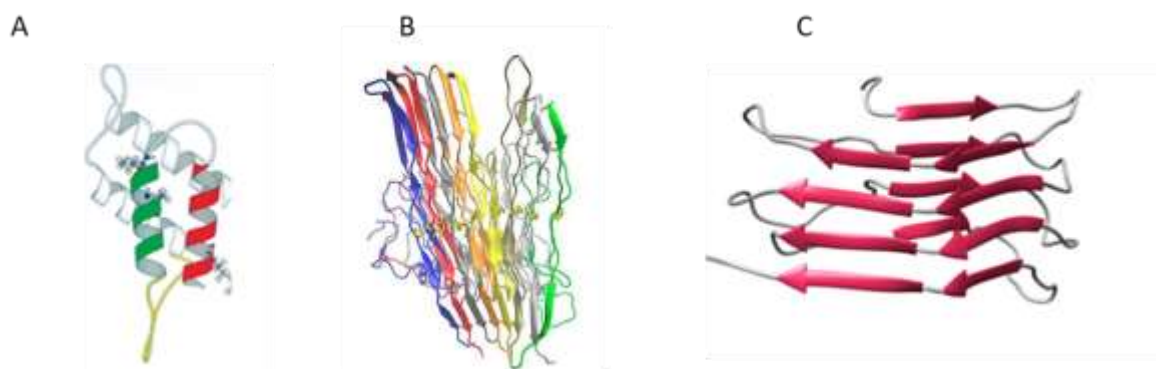


Figura 1. Estructura de la PrP^{C} y PrP^{Sc} A) Modelo de estructura terciaria de PrP^{C} que contiene cuatro hélices alfa, B) estructura de PrP^{Sc} modelo PIRIBS (parallel in-register intermolecular beta-sheet), C) estructura de PrP^{Sc} modelada como 4RβS (cadenas β representadas como flechas rojas).

La PrP^{C} y la PrP^{Sc} , además de en su conformación, presentan diferencias en otros aspectos: la PrP^{C} es insoluble en detergentes no iónicos y fácilmente digerida al ser sometida a digestión con proteinasa K (PK), mientras que la forma PrP^{Sc} es

parcialmente resistente a la digestión con PK, y tras la digestión adquiere un tamaño de 27-30 kD (Bolton et al., 1982).

De esta manera la PrP^C es la versión fisiológica de la proteína y no produce enfermedad, sino que al contrario, cumpliría funciones fisiológicas celulares normales, mientras que la PrP^{Sc} es la versión infecciosa y es la responsable de las EETs. La PrP^{Sc} sirve de molde para una rápida conversión de la PrP^C, la cual se transforma en la forma patógena (Horwich and Weissman, 1997).

El papel de la PrP^C en el organismo no es totalmente conocido (Weissmann and Flechsig, 2003). Conocer las funciones fisiológicas de la PrP^C sería importante para comprender su papel en el entorno patológico no solo en las encefalopatías espongiformes (Manni et al., 2020), sino también, en la enfermedad de Alzheimer (Condello et al., 2020) y los trastornos inmunológicos o el cáncer (Mouillet-Richard et al., 2021).

La PrP^C se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso, tras lo cual es dirigida al aparato de Golgi y posteriormente se localiza en la superficie celular (Harris, 2003). Es una proteína celular normal, activa en varios tejidos y órganos del cuerpo como el corazón, músculo, componentes celulares del sistema inmune, riñón, el útero, las glándulas suprarrenales, glándula mamaria y otros (Linden et al., 2008). Sin embargo, se expresa principalmente en el sistema nervioso central (SNC) (Chesebro et al., 1985), específicamente en las neuronas y las células de la glía (Lima et al., 2007) y participa en varios procesos celulares como la

diferenciación celular, la supervivencia neuronal, el crecimiento de las neuritas, la función de la sinapsis y la liberación de neurotransmisores (Aguzzi et al., 2008). Se han descrito muchas otras funciones que asocian la participación de la PrP^C en la respuesta inmune, regulando la función de los mastocitos y la activación de los linfocitos T, la participación en la homeostasis de la glucosa, la homeostasis del cobre y la excitabilidad neuronal, la modulación del ritmo circadiano y la respuesta al estrés del RE que es causado por la acumulación de proteínas mal plegadas (Chiarini et al., 2002, Brown et al., 2002, Kim et al., 2004, Castle and Gill, 2017). Varias evidencias apuntan a que la PrP^C tiene una función citoprotectora e inhibe potentemente la muerte celular. En cultivos celulares se ha visto que esta proteína confiere neuroprotección a las células contra la privación de suero y los estímulos apoptóticos mediados por la proteína Bax (Bounhar et al., 2001, Kim et al., 2004). Se ha observado en varias líneas celulares cancerígenas que una elevada expresión de PrP confiere supervivencia celular y resistencia a los agentes anticancerígenos (Diarra-Mehrpour et al., 2004). Cuando hay acumulo de proteínas mal plegadas como la PrP^{Sc}, las células en respuesta al estrés del retículo endoplásmico desencadenan una serie de eventos como el aumento de la expresión de chaperonas y la inhibición de la síntesis de proteínas (Castle and Gill, 2017).

2.1. Scrapie clásico

Como se ha referido anteriormente, el scrapie clásico fue la primera enfermedad priónica descrita. La primera descripción fue hecha en ovejas en el Reino Unido (Mcgowan, 1922). Más tarde se detectó la enfermedad en cabras (Chelle, 1942). Su nombre procede del prurito lumbar que presentan los animales infectados. Además, estos animales muestran otros signos neurológicos como ataxia, hiperestesia y caquexia (Acin et al., 2021), si bien una descripción más completa de los signos clínicos se desarrollará en un apartado posterior. La principal vía de transmisión del scrapie natural en ovejas y cabras es por la ingestión de priones presentes en el ambiente procedentes de fluidos corporales como placentas, saliva, orina y heces. Aunque se ha sugerido que puede existir una transmisión intrauterina, es más probable que el contagio de los animales recién nacidos se produzca por el contacto con la placenta y fluidos del parto (Garza et al., 2011, Mammadova et al., 2020). Además, se ha descrito su presencia en el pasto e instalaciones creando un desafío considerable para el control de la transmisión entre animales y se ha descrito que el movimiento de los priones en el polvo que proviene de otros establos es también resistente a la desinfección (Hawkins et al., 2015).

2.2. Scrapie atípico

En 1998, el scrapie atípico se identificó por primera vez en Noruega. Es una enfermedad de distribución mundial que afecta a pequeños rumiantes (Benestad et al., 2003, Andréoletti et al., 2011) apareciendo principalmente en animales adultos de más de 5 años de edad (Simmons et al., 2010). Los signos clínicos son la ataxia, hiperexcitabilidad y pérdida de peso (Benestad et al., 2003). Los portadores del alelo ARR homocigoto y heterocigoto presentan susceptibilidad genética a la enfermedad (Lühken et al., 2004). Existen varias diferencias en cuanto a las manifestaciones clínicas y patológicas entre el scrapie clásico y atípico. En el caso del scrapie atípico los depósitos y lesiones se encuentran en las cortezas cerebelosas y cerebral; la vacuolización es escasa en el tronco encefálico y no se han descrito lesiones en el obex (Benestad et al., 2003, Acín et al., 2021). Se ha detectado infectividad en los tejidos periféricos así como en el sistema linforreticular, músculos y nervios (Andréoletti et al., 2011). Esta enfermedad aparece en ovejas que tienden a ser resistentes al scrapie clásico y se cree que ocurre espontáneamente (Cassard et al., 2014). Las lesiones identificadas en el scrapie atípico, al igual que en la forma clásica, se basan en la degeneración espongiiforme, gliosis y pérdida neuronal (Simmons et al., 2010).

2.3. Factores genéticos

En el caso de la especie ovina, la susceptibilidad al scrapie y el tiempo de supervivencia dependen de los polimorfismos del gen *PRNP*. Los tres

polimorfismos más comunes son: Valina (V) o Alanina (A) en el codón 136, Arginina (R) o Histidina (H) en el codón 154, y Glutamina (Q) o Arginina (R) en el codón 171. La combinación de estas variantes da lugar a los siguientes alelos de la PrP: ARQ, VRQ, AHQ, ARR Y ARH (Goldmann et al., 1990, Hunter, 1997). La combinación de estos alelos da lugar a 15 genotipos diferentes que han sido clasificados en 5 niveles de riesgo pues determinan en parte la susceptibilidad de cada individuo para desarrollar la enfermedad natural (Dawson et al., 1998) (Tabla 2).

El haplotipo VRQ es el más relacionado con la susceptibilidad al scrapie clásico mientras los alelos ARR y AHQ se relacionan con la resistencia a esta enfermedad (Acin et al., 2021). Anteriormente se creía que el genotipo ARR/ARR era totalmente resistente a adquirir la enfermedad, sin embargo, un estudio indicó que los animales de este genotipo pueden infectarse tras la inoculación intracraneal con un aislado de scrapie (Lacroux et al., 2017). En la actualidad se han identificado otros cinco polimorfismos en el gen *PRNP* en los codones 126, 127, 138, 142, 146, 231, 237 del gen *PRNP* (Teferedegn et al., 2020). La variante VRQ es la más frecuente en rebaños infectados mientras que la variante ARR suele estar presente en grupos de animales no infectados (Belt et al., 1995). El diseño periódico de los métodos de vigilancia y control de la enfermedad diseñados en la Unión Europea y otros países son importantes para el control y erradicación de la enfermedad, así también, la implementación de programas de selección genética que permitan erradicar el alelo ARQ y aumentar la cría de animales con genotipo ARR, podría ser la ruta para mejorar la resistencia al scrapie clásico (Bordin et al., 2020).

Tabla 2. Genotipos ovinos y susceptibilidad a desarrollar scrapie clásico (Dawson et al., 1998)

Genotipo	Susceptibilidad
ARR/ARR	Alta resistencia genética
ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ	Resistencia genética
AHQ/AHQ, AHQ/ARH, AHQ/ARQ, ARH/ARH, ARH/ARQ, ARQ/ARQ	Baja resistencia genética
ARR/VRQ	Susceptibilidad genética
AHQ/VRQ, ARH/VRQ, ARQ/VRQ, VRQ/VRQ	Alta susceptibilidad genética

Es importante mencionar que esta clasificación no puede aplicarse para el scrapie atípico, pues si bien las ovejas que expresan los alelos ARR muestran resistencia al scrapie clásico, son susceptibles al scrapie atípico, siendo los genotipos más afectados AHQ/AHQ, AHQ/ARQ y el ARR/ARR (Benestad et al., 2008).

3. Patogenia

Existen todavía numerosos aspectos de la patogenia de las EETs que se desconocen. Hay tres formas de enfermedades priónicas, las esporádicas (cuya causa se desconoce), genéticas o hereditarias (asociadas a mutaciones del gen *PRNP*), y las adquiridas o infecciosas (aquellas que surgen de la exposición a priones por cualquier vía) (Collinge, 2001, Imran and Mahmood, 2011). Todas ellas poseen un evento patogénico común, la conversión de la PrP^C en la isoforma patógena PrP^{Sc}. En el caso del scrapie clásico, la vía oral asociada a la ingestión de material contaminado con el agente causal es la vía natural de infección más probable (Van Keulen et al., 2002). De manera experimental se ha descrito

también la transmisión por vía intralingual, intracerebral e intranasal (Hamir et al., 2008, Haybaeck et al., 2011)

Los mecanismos patogénicos que ocurren en el scrapie dependen de la cepa, la dosis y la ruta de infección (Unterberger et al., 2005). En el scrapie, la contaminación con los restos de placenta expulsados por los animales infectados en el momento del parto es la principal fuente de infección, aunque también parecen jugar un papel la ingestión de leche y calostro (Konold et al., 2008), las heces (Terry et al., 2011) y el semen (Rubenstein et al., 2012).

Cuando el prion penetra por vía oral, la invasión del organismo se produce generalmente a través del tejido linfoide asociado al intestino, principalmente a nivel del íleon. Una vez el prion llega al intestino es transportado al sistema linfoide a través de las células M, células especializadas en el transporte de los patógenos entéricos y causar una respuesta inmune como mecanismo de defensa del huésped (Neutra et al., 1996). Posteriormente, la PrP^{Sc} se acumula y se replica en macrófagos y células dendríticas foliculares (Van Keulen et al., 2002, Mabbott and Bruce, 2001). Algunos autores sugieren que la primera fase de invasión se produce en los tejidos linfoides de la orofaringe y el intestino (amígdala palatina y las placas de Peyer), y también a través de los linfonodos retrofaríngeos, los yeyunales caudales y el linfonodo ileocecal (Van Keulen et al., 2002). La neuroinvasión se inicia en el sistema nervioso entérico, seguidamente el prion viaja a través de las fibras nerviosas eferentes parasimpáticas y simpáticas que inervan el intestino hasta el núcleo motor dorsal del vago en la medula oblongada y la médula espinal (Beekes et al., 1998, Van Keulen et al., 2002). El prion

continúa ascendiendo por la médula espinal torácica y cervical para distribuirse por el cerebro, el diencefalo y la corteza frontal a través del tronco encefálico rostral (Mcbride et al., 2001, Wemheuer et al., 2011). La médula oblongada es la porción diana del SNC donde se acumulan mayor cantidad de depósitos de PrP^{Sc} y es el tejido de elección para el diagnóstico del scrapie clásico (Ryder et al., 2001). En la médula oblongada el obex es el sitio neuroanatómico que presenta cambios vacuolares más tempranos y dichas lesiones se observan mayoritariamente alrededor del núcleo motor dorsal del nervio vago. En el cerebelo la vacuolización del neuropilo suele ser intensa y a difusa en la capa granular extendiéndose a la capa molecular. Además, en la corteza frontal y en los núcleos ventral y medial del tálamo las gliosis y la pérdida neuronal son severas (Wood et al., 1997).

En el scrapie clásico no se descarta una diseminación hematológica del prion siendo considerada ésta una vía de neuroinvasión alternativa (Sisó et al., 2010). Los depósitos de PrP^{Sc} observados en el riñón, glándula mamaria, músculos esqueléticos podrían apoyar esta teoría (Sisó et al., 2010, Lacroux et al., 2017). Estudios previos han demostrado la infectividad de la sangre de ovejas con scrapie y EEB mediante transfusión sanguínea (Hunter et al., 2002, Houston et al., 2008). Se ha podido determinar que los niveles de infectividad en la sangre pueden ser más altos de lo que se sospechaba anteriormente, incluso en las etapas preclínicas de la infección (Hunter et al., 2002).

4. Signos clínicos

Las manifestaciones clínicas del scrapie se desarrollan entre los 2 y 5 años de edad, pero puede ocurrir a cualquier edad, aunque es rara la aparición de signos en animales menores de 1 año (Hoinville, 1996). Los temblores, ataxia y pérdida de la condición corporal son los signos clínicos más comunes del scrapie. Otros signos incluyen cambios de comportamiento, por lo que los animales pueden mostrarse nerviosos y agresivos, presentar resistencia al manejo, mostrar bruxismo y prurito que son signos típicos del scrapie clásico, lo que lleva a que el animal se frote, rasque o mordisque su cuerpo (Healy et al., 2003, Acín et al., 2021). Los rascados y frotamientos intensos provocan alopecias localizadas, traumatismos cutáneos, zonas enrojecidas y costrosas con pérdida de lana y paraqueratosis severa, sobre todo en la parte posterior de la cola como consecuencia de lamido y rascado (Capucchio et al., 2001).

En las etapas más avanzadas de la enfermedad, los animales pueden desarrollar signos más graves que incluyen la paresia, incluso pueden caer en coma y morir. También se ve afectado el comportamiento a la hora de comer y beber, ya que los animales afectados comen y beben en pequeñas cantidades. Otros signos que se han descrito son el temblor de cabeza, alteración del estado mental, postura agachada y déficits propioceptivos de las extremidades. La progresión de la enfermedad se caracteriza por un aumento en la frecuencia y gravedad de la ataxia, debilidad e hipermetría de las extremidades posteriores, una respuesta de balanceo disminuida y una respuesta extensora reducida a la presión

toracolumbar (Healy et al., 2003). Durante la fase final de la enfermedad los animales muestran postración, con la cabeza baja, hasta que se produce la muerte (Capucchio et al., 2001)

El principal signo clínico desarrollado por los animales afectados con la variante Nor98 es la ataxia, dada la especial afectación del cerebelo en esta enfermedad. Además, destaca la escasa presencia o ausencia de prurito. En la mayoría de los animales afectados también se ha observado pérdida de peso, depresión, temblores (especialmente de la cabeza), pérdida del reflejo de amenaza, separación de las extremidades traseras y ataxia con postura agachada. Es característico también el retraso o la falta del reflejo de reposicionamiento de las extremidades traseras cuando las extremidades son abducidas o el animal es empujado hacia un lado (Konold et al., 2007).

5. Diagnóstico

El problema que se planteó en un inicio para el diagnóstico del scrapie, así como para las demás EETs, fue que la determinación de la presencia del agente causal resulta compleja ya que carece de material genético (Prusiner, 1982). Por otro lado, la infección por priones no produce una respuesta inmune humoral, por lo que no se generan anticuerpos frente al prion. Así pues, el diagnóstico de estas enfermedades con técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o con pruebas serológicas no es posible.

Así, las técnicas usadas para el diagnóstico de las EETs se realizan *post-mortem*, utilizando tejido del sistema nervioso central (OIE,200) donde las concentraciones de PrP^{Sc} son más altas (Kübler et al., 2003). Las lesiones microscópicas características son la neurodegeneración espongiiforme, la gliosis, la pérdida neuronal y la acumulación de PrP^{Sc} (Wells et al., 1987). Por ello, un método de diagnóstico clásico de estas enfermedades fue el estudio histopatológico del encéfalo, para evidenciar las lesiones descritas que pronto fue complementado con la técnica de la inmunohistoquímica (IHQ), método que permite la detección de la PrP^{Sc} en el SNC al ser el único marcador de la enfermedad (Prusiner, 1998). La IHQ permite detectar la proteína patológica, su distribución en el tejido, localización celular y las características morfológicas de la acumulación en el encéfalo (González et al., 2003). Actualmente se realiza la detección directa del fragmento resistente a la digestión con PK de la PrP^{Sc}. En la actualidad, solo en el scrapie se habla de un método de diagnóstico *in vivo* aunque no siempre totalmente fiable, que se basa en la inmunodetección de la PrP^{Sc} en el tejido linfóide, obtenido mediante biopsia del recto, del tercer párpado o de las amígdalas (Gavier-Widén et al., 2005).

Otro método rápido y de alta sensibilidad usado para el diagnóstico de estas enfermedades es el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) (Deslys et al., 2001). Esta técnica proporciona resultados cuantitativos a través de la detección inmunoquímica de la PrP^{Sc} en varias regiones del SNC o en el tejido linfóide mediante el uso de anticuerpos. La principal ventaja de esta prueba es que permite analizar un elevado número de animales y favorece la automatización. Actualmente en el mercado se dispone de

varios test rápidos que han sido evaluados y aprobados por la Unión Europea. Al ser pruebas rápidas, se usan en programas de vigilancia epidemiológica (Bolea et al., 2005). Las lesiones microscópicas que caracterizan al scrapie clásico son la vacuolización bilateral y simétrica generalmente en el neuropilo de la materia gris y el pericarion neuronal, afectando principalmente a las astas dorsales de la médula espinal, a los núcleos del tracto espinal del trigémino, del tracto solitario y el dorsal del vago, al hipotálamo y al tálamo (Wood et al., 1997, Acin et al., 2021). Sin embargo, la distribución de las lesiones depende de la cepa del prion y del genotipo del hospedador. Se debe tener en cuenta la conservación del tejido para evitar la autólisis previa a la valoración de las lesiones y evitar errores en el diagnóstico por la aparición de una vacuolización artificial (Gavier-Widén et al., 2005). Estas características del scrapie clásico permiten diferenciarlo del atípico, ya que en este último apenas hay espongiosis en el tronco del encéfalo, y las lesiones, como ya ha sido referido se localizan principalmente en el cerebelo y en la corteza cerebral (Simmons et al., 2010).

Otra técnica de diagnóstico de las enfermedades priónicas es el Western blot. Este se caracteriza por una alta sensibilidad y rapidez, ofreciendo resultados cualitativos del fragmento resistente a la PK, conocido como PrP²⁷⁻³⁰ o PrP^{res} (Oesch et al., 1985, Deslys et al., 2001). En esta técnica la PrP^{res} se detecta mediante el uso de anticuerpos específicos y sirve para poder confirmar el diagnóstico de estas enfermedades cuando el examen histopatológico no es convincente o el tejido ha sufrido autólisis o simplemente para verificar la veracidad del estudio inmunohistoquímico (Katz et al., 1992).

Además, existen otras técnicas no convencionales para detección de priones, como son la amplificación cíclica de proteínas mal plegadas (protein misfolding cyclic amplification; PMCA), que surgió como una técnica ultrasensitiva para detectar priones in vitro. Esta técnica permite amplificar cantidades diminutas de PrP^{Sc} contenidas en una muestra utilizando un sustrato que contenga un exceso de PrP^C (Soto et al., 2002). Para que se produzca la amplificación la muestra se somete a ciclos de incubación y sonicación para permitir la conversión de la PrP^C contenida en el sustrato. El objetivo es inducir el crecimiento de los polímeros de PrP^{Sc} y luego descomponerlos, multiplicando así, el número de unidades de conversión a partir de una semilla. (Soto 2002). Otra técnica in vitro que se utiliza para la detección ultrasensitiva de priones es la conversión inducida por temblores en tiempo real (RT-QuIC) (Wilham et al., 2010). Este método induce la amplificación de la PrP^{Sc} de la semilla utilizando como sustrato una PrP^C recombinante. Los resultados de la amplificación de las muestras se analizan en tiempo real mediante la unión de la PrP^{Sc} al colorante fluorescente tioflavina T. En el scrapie este método de diagnóstico resulta útil y muy prometedor en el diagnóstico de animales en la fase preclínica (Mammadova et al., 2020) esto permitiría aislar a los animales antes de la manifestación de signos clínicos.

A pesar de que el diagnóstico definitivo de las EETs suele llevarse a cabo en el encéfalo al ser el órgano que acumula mayores cantidades de PrP^{Sc}, se ha evidenciado la presencia de priones en muchos otros tejidos y fluidos, como la sangre (Brown et al., 2005, Castilla et al., 2005), el líquido cefalorraquídeo

(Atarashi et al., 2007), las heces (Safar et al., 2008), la orina (Gregori et al., 2008). Así también, se ha demostrado infectividad en las amígdalas, el bazo y los ganglios linfáticos retrofaríngeos, mesentéricos y preescapulares (Langeveld et al., 2006), riñón (Ligios et al., 2007), ilion distal y mucosa rectal (Acín et al., 2021). La presencia de PrP^{Sc} en las glándulas salivales sugiere una posible infectividad de esta secreción (Vascellari et al., 2007). Los avances en los métodos de detección están enfocados en poder detectar esta enfermedad en etapas tempranas de la enfermedad tanto en animales como en humanos utilizando muestras de fluidos biológicos.

El bioensayo en animales sigue siendo el método más sensible para la detección de la infectividad de las EETs. Los animales de laboratorio, especialmente los ratones transgénicos, han sido usados durante muchos años para estudiar el comportamiento de la enfermedad in vivo, tipificar las cepas priónicas y cuantificar los priones contenidos en los aislados a través de la inoculación en animales y la posterior identificación de la PrP^{Sc}. Los bioensayos, sin embargo, presentan limitaciones, como los largos periodos de incubación, el uso intensivo de animales, costes elevados y razones éticas, sin embargo, las ventajas de este método es que la inoculación en modelo murino permite caracterizar al agente causal, aporta información importante sobre el comportamiento y progreso de la enfermedad y, sobre todo, proporciona información sobre los periodos de supervivencia (Brandner and Jaunmuktane, 2017).

En resumen, la PrP^{Sc} es el único marcador bioquímico para las EETs y se puede detectar a través de técnicas convencionales como el WB y la IHQ principalmente en el SNC pero también en tejidos linfoides como la amígdala palatina, linfonodo retrofaríngeo, bazo y tercer párpado, por lo que de hecho, se valora mucho el potencial diagnóstico en la fase preclínica en los tejidos linfoides en el scrapie natural. Estos tejidos acumulan PrP^{Sc} en fases tempranas de la enfermedad siendo adecuados para el estudio post mortem de los animales clínicamente no afectados (Vascellari et al., 2005).

6. Neurodegeneración en las enfermedades priónicas

El hecho patogénico clave en la enfermedad priónica es el mal plegamiento y la agregación de la PrP^C. Se estima que un 10% de la PrP^C se pliega incorrectamente de manera natural y no sale del RE a través del tráfico vesicular (Yedidia et al., 2001). El hecho de que la inactivación del gen *PRNP* en ratones y vacas no provoque neurodegeneración, indica que la patogénesis del prion no se debe a la pérdida de la función de PrP^C, sino a una ganancia de toxicidad tras su conversión a PrP^{Sc} (Steele et al., 2007). Sin embargo, la continua producción y conversión endógena de PrP^C es indispensable para replicar la infectividad priónica, lo que causa disfunción neuronal y muerte (Chiesa, 2015). Durante la patogénesis de las enfermedades priónicas se ha descrito que las chaperonas moleculares juegan un papel importante en el replegamiento de estas proteínas o la eliminación de la proteína patógena, siendo un componente esencial en el

control de calidad de la homeostasis celular (Ciechanover and Kwon, 2017). También se ha descrito que uno de los factores que podrían contribuir a la neurodegeneración es que la acumulación de PrP^{Sc} en el cerebro colapsa el sistema ubiquitina-proteasoma lo que conduce al estrés del RE y por tanto a una inadecuada proteostasis celular (Kang et al., 2004). El mantenimiento de la proteostasis es vital para asegurar la supervivencia celular (Ghemrawi and Khair, 2020). Además de las enfermedades priónicas, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica también se han asociado con trastornos en la maquinaria del RE y la consiguiente acumulación de proteínas mal plegadas (Hetz and Mollereau, 2014, Milisav et al., 2015). No se conoce con exactitud la patogenia de las enfermedades priónicas, aunque se ha propuesto que tanto el estrés del RE como la disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS), eventos de los que hablaremos en apartados posteriores, ocurren durante la patogénesis de las enfermedades priónicas espontáneas (Otero et al., 2021).

7. Estrés del Retículo endoplásmico (RE)

El RE es un orgánulo que se localiza en el citoplasma de las células eucariotas, lleva a cabo la traducción, plegamiento y transporte de proteínas a través de la vía secretora (Hetz et al., 2011), tiene funciones vitales como la síntesis de colesterol y otros lípidos. Además, mantiene la homeostasis del Ca⁺ necesario para la óptima función de chaperonas y enzimas plegadoras (Hetz and Mollereau, 2014,

Ghemrawi and Khair, 2020). Cuando una proteína es sintetizada y pasa el proceso de control de calidad, las proteínas correctamente plegadas toman la ruta hacia la membrana celular o el espacio extracelular (Hetz et al., 2011, Xiang et al., 2017). Generalmente, las proteínas sintetizadas en el RE se transportan al complejo de Golgi y más allá sólo cuando han alcanzado el plegamiento y ensamblaje correcto (Hammond and Helenius, 1994). Si la proteína no se ha ensamblado correctamente será retenida en el RE para reparar su defecto o ejecutar su degradación. La acumulación de proteínas mal plegadas dentro de la célula conduce al “estrés del RE” (Ghemrawi and Khair, 2020). Las células utilizan varias vías de control de calidad para contrarrestar el estrés del RE. Uno de ellos es la respuesta a proteínas desplegadas (UPR), la degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD) (Hampton, 2002) y la autofagia (López-Pérez et al., 2020) mecanismos indispensables para mantener la homeostasis del RE y de la célula.

8. Respuesta a proteínas desplegadas

La respuesta de proteína desplegada (UPR) es el principal mecanismo que se activa como resultado del estrés celular que se origina cuando la proteína desplegada se acumula en el RE (Figura 2). El origen del mal plegamiento de proteínas puede deberse a varios factores como por ejemplo: daño en el ADN, moléculas reactivas de oxígeno, mutaciones genéticas o en la transmisión de priones (Shacham et al., 2021). La UPR está controlada por tres proteínas sensoras: PERK (quinasa del RE similar a PKR), IRE1 α (quinasa transmembrana

que requiere inositol y ATF6 (factor de transcripción activador 6) (Hetz and Papa, 2018, Hughes and Mallucci, 2019, Ghemrawi and Khair, 2020). En ausencia de estrés celular, estas proteínas se asocian con la proteína BiP (proteína de unión a inmunoglobulina) y permanecen inactivas (Hetz, 2012, Ghemrawi and Khair, 2020). En principio, la UPR bloquea la transcripción de proteínas secretoras y aumenta la eliminación de proteínas mal plegadas a través de la degradación asociada a ER (ERAD) o degradación lisosomal, principal mecanismo de control de calidad del RE que reconoce las proteínas mal plegadas y las reubica en el citosol para ser degradadas por el sistema ubiquitina-proteasoma (Hwang and Qi, 2018). Además, se requiere de la síntesis de chaperonas y foldasas residentes en el RE que asistan una vez activada la alarma de control de calidad para evitar la acumulación de proteínas aberrantes causantes de enfermedades (Halperin et al., 2014, Ciechanover and Kwon, 2017). Si la UPR no logra controlar el aumento de proteínas desplegadas, finalmente conduce a la célula a la apoptosis (Hetz, 2012, Hiramatsu et al., 2015)

8.1. Quinasa del retículo endoplásmico (PERK)

Las células neuronales son sensibles al mal plegamiento de proteínas. En condiciones de estrés del RE, tras la unión de una proteína mal plegada a BiP, se liberan las proteínas PERK, IRE1 y ATF6 (Carrara et al., 2015). Tras ésta disociación, PERK se oligomeriza y se autofosforila (p-PERK). Posteriormente, PERK fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota

(eIF2 α). El eIF2 α fosforilado (p-eIF2 α) detiene la síntesis global de proteínas y promueve la activación de ATF4 y también la expresión genes favorables a la supervivencia celular (Liu et al., 2015). Si el estrés no se resuelve, se activan genes preapoptóticos (Hughes and Mallucci, 2019). La activación de la vía PERK da como resultado la inhibición transitoria de la síntesis de proteínas, por lo que la activación de esta vía se ha considerado como un enfoque terapéutico en las enfermedades neurodegenerativas (Shacham et al., 2021). Sin embargo, se ha sugerido que la fosforilación prolongada del factor eIF2 α contribuye a la patogenicidad y toxicidad de los priones (Moreno et al., 2012). También se ha evidenciado la activación y expresión de la chaperona PERK en tejidos cerebrales post mortem de pacientes con enfermedad de Alzheimer (Hoozemans et al., 2009). Otros estudios describieron un aumento de PK-P y eIF2 α -P a lo largo del curso de la enfermedad priónica humana (Moreno et al., 2012) y en modelos murinos inoculados por vía intracerebral (Unterberger et al., 2006). Recientemente, pudimos identificar mediante un estudio inmunohistoquímico una sobreexpresión de la proteína PERK en el cerebro de ratones afectados por enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021). Por ello, con los datos obtenidos no se puede dar una respuesta definitiva acerca de si la activación de la vía PERK es beneficiosa en el transcurso de las enfermedades neurodegenerativas, pues aunque la activación de esta vía inhibe la síntesis proteica, también se ha demostrado que la activación prolongada de PERK afecta a la memoria y promueve la neurodegeneración (Ohno, 2018). Asimismo, inhibir la vía PERK permite restaurar la síntesis de proteínas y evitar la pérdida neuronal (Radford et al., 2015). De hecho, los inhibidores de PERK han mostrado efectos

neuroprotectores en ratones con enfermedad priónica (Moreno et al., 2012). En conclusión, la activación insuficiente de esta vía provoca la acumulación de proteínas mal plegadas que interfieren con la homeostasis del RE, y la activación crónica de la misma anula la síntesis de nuevas proteínas conduciendo a la célula a la apoptosis.

8.2. Proteína de unión a inmunoglobulina (BiP)

La activación de la UPR favorece la expresión de chaperonas como BiP y proteínas disulfuro isomerasas (PDI), como PDIA1 y PDIA3 (Grp58) (Turano et al., 2002).

BiP es una proteína que reside en el RE, y es miembro de la familia de proteínas de choque térmico de 70kDa (Flynn et al., 1991). En células eucariotas no estresadas, BiP mantiene su unión a las proteínas transmembrana del RE que participan en la UPR, inactivando la ruta de las proteínas PERK, IRE1 y ATF6. Se sugiere que BiP tiene una doble función en las células: primero detectar proteínas mal plegadas uniéndose a ellas y luego activar las proteínas sensoras que desencadenan la UPR (Carrara et al., 2015). Cuando la célula detecta la acumulación de proteínas mal plegadas, BiP actúa como sensor primario y se disocia de las chaperonas citadas anteriormente, permitiendo su activación. BiP entonces se une a las regiones hidrofóbicas expuestas de las proteínas mal plegadas y regula la UPR, siendo capaz de reducir los niveles de estrés del RE (Park et al., 2017). Un estudio demostró que BiP acompaña el plegamiento de la

PrP y desempeña un papel fundamental en la vía de maduración de esta proteína (Jin et al., 2000). Por otro lado, si los niveles de BiP disminuyen se acelera el desarrollo de la patología priónica (Park et al., 2017). Existen estudios que revelan el aumento de la chaperona BiP en encéfalos de casos esporádicos de ECJ (Hetz et al., 2003). Por otra parte, se ha descrito la sobreexpresión de BiP sólo en la fase terminal del scrapie murino (Turano et al., 2002). Además, se demostró que la expresión de esta proteína reduce los niveles de PrP^{Sc} en células infectadas con priones de scrapie (Park et al., 2017). Recientemente, hemos descrito aumentos significativos de esta chaperona en modelos murinos afectados por una enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021). Estos hallazgos indican que la chaperona BiP está implicada en múltiples mecanismos patogénicos asociados a la neurodegeneración por lo que se requieren más estudios para evaluar su participación como chaperona y sensor de estrés en respuesta a proteínas mal plegadas dentro del RE.

8.3. Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

La PDI es una chaperona del RE de 55kDa (Perri et al., 2016). Interviene en el correcto plegamiento y en la formación de enlaces disulfuro de las proteínas sintetizadas en este orgánulo (Wang, 1998). La formación de enlaces disulfuro es un aspecto clave del plegamiento de proteínas, es importante para estabilizar la estructura proteica ya que en ausencia de estos enlaces se produciría una

alteración de la conformación proteica, dando lugar a proteínas mal plegadas (Perri et al., 2016).

Se ha descrito una sobreexpresión de las proteínas de la familia PDI en encéfalos de pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jacob esporádica (Yoo et al., 2002). También se ha descrito un aumento de la expresión de esta proteína en el encéfalo de modelos murinos de enfermedad priónica infecciosa, observándose que la sobreexpresión de PDI comienza en estadios tempranos de la enfermedad y va aumentando progresivamente hasta la fase terminal (Wang et al., 2012). La sobreexpresión de esta proteína también se ha observado en modelos murinos de enfermedad priónica espontánea desde la fase preclínica, siendo el marcador del estrés del RE más alterado de entre todos los analizados (Otero et al., 2021). Estos estudios sugieren que esta chaperona puede desempeñar un papel importante en la respuesta celular, corrigiendo el mal plegamiento de proteínas y protegiendo a la célula frente a la toxicidad de la PrP^{Sc} (Yoo et al., 2002, Hetz et al., 2005). De hecho, los estudios *in vitro* demostraron que la disulfuro isomerasa Grp58, otro miembro de la familia PDI, es un factor de supervivencia clave actuando como un factor neuroprotector contra la apoptosis (Hetz et al., 2005). Wang y colaboradores, sin embargo, sugieren que el papel de esta proteína durante la patogenia de las enfermedades priónicas es complejo, pues regula el estrés del RE en los estadios iniciales favoreciendo la supervivencia celular, mientras que en la etapa terminal de la enfermedad facilita los procesos de apoptosis (Wang et al., 2012). El estudio inmunohistoquímico en ratones afectados por una enfermedad priónica espontánea reveló una sobreexpresión significativa de PDI en la etapa clínica de enfermedad en numerosas regiones del encéfalo

(Otero et al., 2021). En general, la participación de las chaperonas residentes en el RE, como la PDI, está implicada en la protección contra la muerte celular a consecuencia del estrés (Mayer et al., 2000, Tanaka et al., 2020). La UPR aumenta la expresión de chaperonas para corregir la proteína mal plegada o promover su translocación al citoplasma para la degradación a través del UPS (Zheng et al., 2016).

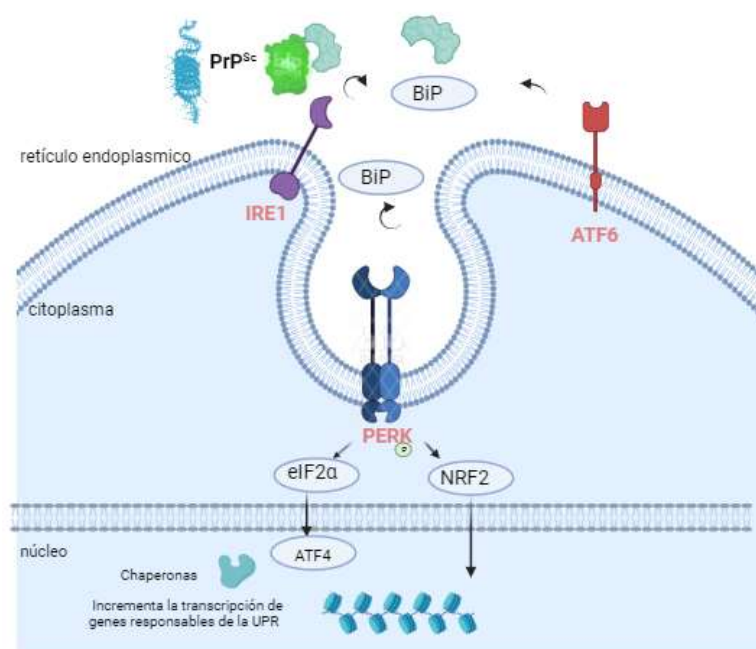


Figura 2. Respuesta a proteínas desplegadas (UPR). Bajo estrés por la acumulación de PrP^{Sc}, las células activan la UPR para establecer la homeostasis celular. Los sensores IRE1, PERK y ATF6 se activan tras la disociación de BiP y PERK se autofosforila (p-PERK). Posteriormente, PERK fosforila la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariota (eIF2 α). El eIF2 α fosforilado (p-eIF2 α) detiene la síntesis global de proteínas y promueve la activación de ATF4 que promueven la expresión de chaperonas.

8.4. El sistema ubiquitina proteasoma (UPS)

Es el principal sistema de control de calidad para seleccionar proteínas y degradar aquellas que no estén correctamente plegadas. El proteasoma se localiza en el citoplasma y núcleo de las células eucariotas, desempeñando un papel crucial en el recambio de proteínas intracelulares (Bibo-Verdugo et al., 2017). El proteasoma controla la homeostasis general de proteínas y la respuesta al estrés, así como, el control de procesos vitales como la división celular y la transducción de señales (Bard et al., 2018). La proteólisis mediada por la UPS consiste en dos pasos, el primero es la unión de moléculas de proteína ubiquitina a las proteínas que deben ser degradadas y segundo se produce la degradación de proteínas ubiquitinadas por el proteasoma (Jin et al., 2000). El proteasoma está conformado por 76 aminoácidos, con un peso molecular de 8.6 KDa y juega un papel esencial en varios mecanismos celulares. El proteasoma 26S está formado por 2 subunidades 19S y una 20, la subunidad 19S a su vez está formada por una base y una tapa (Livneh et al., 2016). La subunidad 20S aparece como una estructura cilíndrica y está formada por dos anillos α y dos anillos β , los externos contienen 7 subunidades α ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) y los internos 7 subunidades β ($\beta 1$ - $\beta 7$) (Tanaka, 2009). Las proteínas que serán degradadas son primero desubicitinadas y desdobladas por la subunidad 19S para posteriormente llegar a la cavidad central formada por los cuatro anillos de la subunidad 20S en donde son degradadas. La ubiquitina se encuentra libre en el citoplasma o conjugada con otras moléculas, siendo importante para el mantenimiento de la función celular en condiciones normales o de estrés celular. La conjugación de la ubiquitina da como resultado la

monoubiquitinación o poliubiquitinación de sustratos diana, y en condiciones de estrés se produce la activación de genes de poliubiquitina. Los genes de poliubiquitina se expresan en gran medida en las células germinales y en las neuronas hipotalámicas lo que sugiere que los niveles de ubiquitina libre en las neuronas o en las células vecinas son importantes para la función y supervivencia neuronal (Park and Ryu, 2014).

Existen evidencias que apuntan hacia una posible implicación del UPS en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas producidas por la acumulación de proteínas. Se ha descrito que, en la mayoría de enfermedades neurodegenerativas existen agregados proteicos producidos por un desequilibrio entre la síntesis y degradación de proteínas como es el caso de la enfermedad de Alzheimer (Li et al., 2021). En las enfermedades priónicas, los animales infectados suelen presentar niveles elevados de conjugados de ubiquitina al verse inhibida la función del proteasoma (Figura 3). Un estudio ha demostrado la ubiquitinación de proteínas cerebrales en ratones infectados por scrapie (Kang et al., 2004) y se ha comprobado que la PrP^{Sc} es capaz de inhibir específicamente la subunidad 26S del proteasoma (Kristiansen et al., 2007). Anteriormente, estudiamos la actividad del proteasoma en la línea transgénica TgVole-Ub^{G76V-GFP}, una línea de ratones que desarrollan una enfermedad priónica espontánea y que a su vez expresan una ubiquitina marcada con GFP, lo cual permite monitorizar la actividad de proteasoma in vivo (Green fluorescent protein) (Lindsten et al., 2003). Se observó que los ratones que habían desarrollado la enfermedad priónica espontánea mostraron una acumulación significativamente mayor de Ub^{G76V-GFP} que los

controles sanos de la misma edad. También se observaron diferencias significativas en la acumulación de esta molécula en los ratones que se encontraban en la fase preclínica, por lo que se dedujo, como han sugerido otros autores (Mckinnon et al., 2016; Lowe et al., 1993), que la acumulación de agregados de ubiquitina supone un mecanismo patogénico temprano de las enfermedades priónicas (Mckinnon et al., 2016, Otero et al., 2021).

Finalmente, en el scrapie natural, no se ha estudiado la actividad del sistema ubiquitina-proteasoma, pero sí se ha detectado la activación de vías apoptóticas (Serrano et al., 2009).

Es necesario comprender los mecanismos moleculares del estrés del RE y la relación con la presencia de PrP^{Sc} para proporcionar nuevas alternativas terapéuticas en el tratamiento de las enfermedades priónicas. Asimismo, las chaperonas implicadas en estos mecanismos y el UPS pueden ser objetivos terapéuticos clave para enfermedades caracterizadas por agregados proteicos.

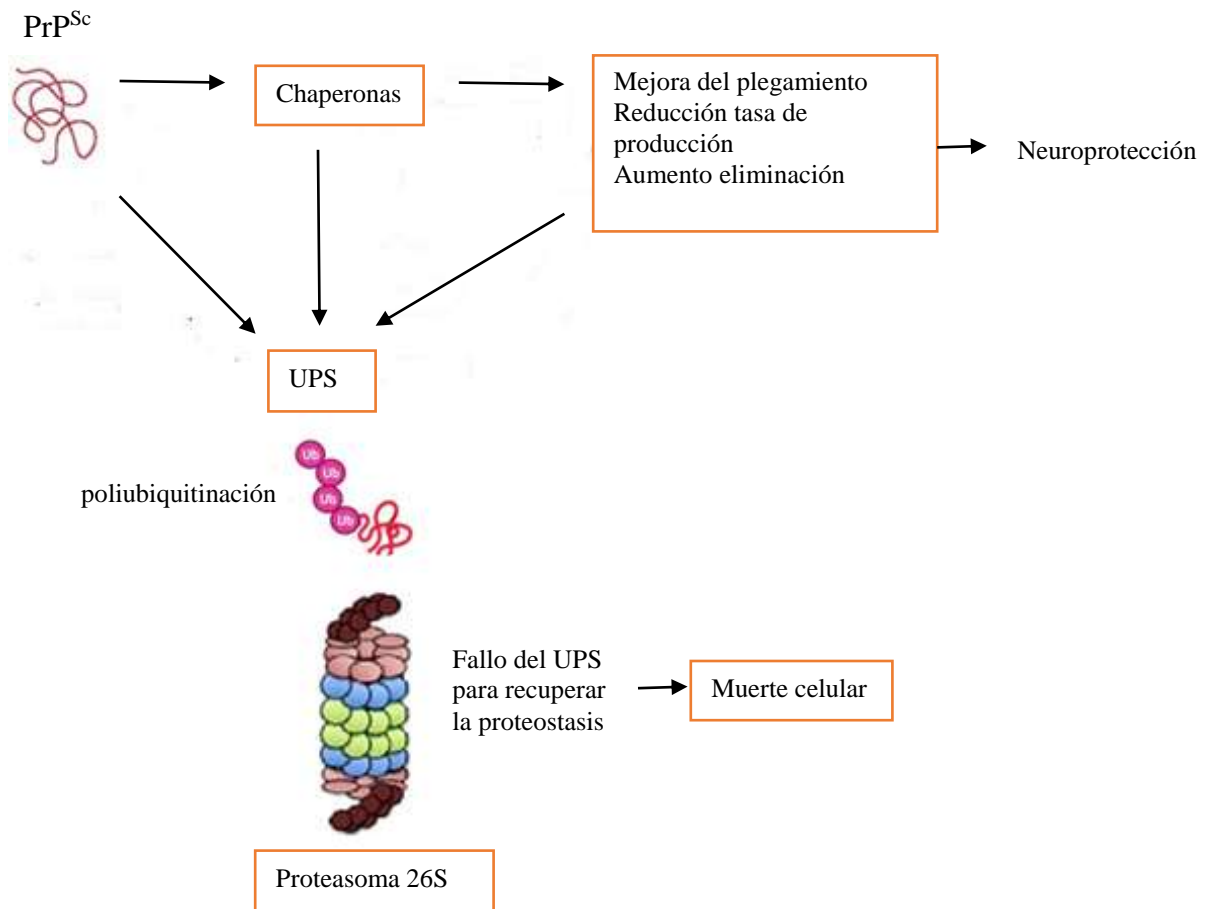


Figura 3. Deterioro del sistema ubiquitina-proteasoma. Cuando se produce una acumulación de proteína mal plegada (PrP^{Sc}) en el interior de retículo endoplásmico, la actividad de las chaperonas corrige su plegamiento, reduce la tasa de producción de la proteína mal plegada, y aumenta la tasa de eliminación por la vía de degradación ubiquitina proteasoma (UPS). Los agregados de proteína mal plegada inhiben directamente la función de proteasoma 26S.

METODOLOGÍA

9.1. Animales y muestreo

Para la realización de este estudio se utilizaron muestras de encéfalo de ovejas infectadas por scrapie de forma natural y muestras de encéfalo de ovejas negativas del banco de tejidos del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes de la Universidad de Zaragoza. El estudio con animales fue revisado y aprobado por la Comisión Asesora de experimentación animal de la Universidad de Zaragoza de Zaragoza (código de identificación: P138/15) y se realizó bajo su supervisión. Además, todos los procedimientos con animales siguieron las directrices incluidas en la ley española de protección de los animales RD53/2013 y la Directiva 2010/63 de la Unión Europea relativa a la protección de los animales utilizados para experimentación. La recogida de muestras y los detalles demográficos de los animales se describieron en un estudio previo (Betancor et al., 2022). En total se utilizaron muestras de encéfalo de 21 ovejas de la raza rasa aragonesa. Todas las ovejas eran hembras de 4 a 5 años del genotipo ARQ/ARQ para el gen *PRNP*. 8 animales fueron eutanasiados en fase clínica, 5 animales en fase preclínica, y 8 animales eran controles sanos. Los signos clínicos de scrapie detectados en los animales clínicos fueron signos neurológicos como prurito, hiperestesia y caquexia, bruxismo, alopecia por rascado continuo e hiperexcitabilidad a estímulos externos. Asimismo, el diagnóstico de scrapie preclínico se realizó mediante análisis inmunohistoquímico de biopsias de mucosa rectal para la detección de PrP^{Sc}. Los 8 animales del grupo control procedían de un rebaño en el que no se había registrado nunca ningún

caso de scrapie. La eutanasia se realizó mediante sobredosis intravenosa de pentobarbital, tras la cual se realizó la necropsia completa de los animales. El SNC fue extraído y las muestras tomadas consistieron en dos réplicas de nueve áreas: médula espinal (Sc), médula oblongada (Mo), cerebelo (Cbl), hipotálamo (Ht), tálamo (T), corteza parietal (Pc), ganglios basales (BG), corteza a nivel de los ganglios basales (BGc) hipocampo (Hc) y corteza frontal (Fc). La mitad de estas muestras fueron fijadas en formol al 10% para la realización de análisis histopatológicos e inmunohistoquímicos y el otro replicado fue congelado a -80°C para análisis bioquímicos. Para los análisis de expresión génica, se recogieron muestras de corteza frontal, tálamo, hipocampo y médula oblongada en solución RNAlater™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU).

9.2. Análisis histológicos e inmunohistoquímicos

Para la realización de las técnicas histopatológicas, las muestras de SNC fijadas en formol fueron talladas e incluidas en parafina. Posteriormente se realizaron secciones de tejido de 4 µm de grosor utilizando un microtomo. Dichas secciones fueron recogidas en portaobjetos y secadas toda la noche a 56°C.

Las muestras se tiñeron con hematoxilina y eosina para analizar las lesiones espongiiformes. La detección inmunohistoquímica de la proteína priónica se realizó como se describe en un estudio anterior (Betancor et al., 2022). Brevemente, tras el desparafinado y rehidratado de las muestras, se realizó un proceso de desenmascarado de epítomos consistente en incubación con 4µg/ml de proteasa K

(Roche, Basilea, Suiza) durante 15 min a 37°C, seguido por un tratamiento con ácido fórmico al 98% durante 10 min y autoclavado hidratado en buffer citrato (pH 6) durante 20 min a 96°C. Posteriormente, las muestras fueron incubadas con una solución para el bloqueo de la peroxidasa endógena (Dako Glostrup, Dinamarca) durante 10 min. La inmunodetección se realizó utilizando el anticuerpo primario monoclonal L42 (1:500, R-Biopharm, Darmstadt, Alemania) durante 1h seguido de una incubación de 30 min con el polímero marcado Envision mouse HRP (Dako Glostrup, Dinamarca). Como cromógeno se utilizó la diamenobenzidina (DAB, Dako) durante 5 min y posteriormente las muestras fueron contrateñidas con hematoxilina.

Para la detección inmunohistoquímica de los cuatro marcadores de estrés del RE utilizamos diferentes anticuerpos primarios: ab79483, Abcam (Cambridge, Reino Unido) para la proteína PERK, ab108613, Abcam (Cambridge, Reino Unido) para la proteína BiP, sc-166474, Santa Cruz Biotechnology, (Dallas,Texas, EE.UU.) para la proteína PDI y ab7780, Abcam (Cambridge, Reino Unido) para la proteína Ubiquitina. Tras ser desparafinadas, las muestras se hirvieron en una solución de tampón citrato (pH 6,0) durante 20 min a 96 °C para realizar el desenmascarado de epítomos. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó mediante incubación con una solución de bloqueo lista para usar (Dako Agilent, Glostrup, Dinamarca) durante 15 min. Después, las secciones de tejido se incubaron durante la noche a 4°C con los citados anticuerpos monoclonales y policlonales comerciales diluidos en un diluyente de anticuerpos EnVision FLEX prefabricado (Dako, Glostrup, Dinamarca) (Tabla 3). La inmunodetección se realizó utilizando un polímero Envision anti-rabbit (Dako, Glostrup, Dinamarca) o un polímero

Envision anti-mouse (Dako, Glostrup, Dinamarca), durante 30 min a temperatura ambiente seguido de incubación con DAB (Dako, Glostrup, Dinamarca) como sustrato cromógeno.

Tabla 3. Protocolos inmunohistoquímicos utilizados para la detección de marcadores de estrés de RE.

Anticuerpo	Nº clon	Isotipo	Fabricante	Recuperación de antígenos	Dilución
Anti-PERK	Polyclonal	Conejo	Abcam,	Citrato pH 6.0,	1:250
	ab79483	IgG	Cambridge, Reino Unido	10 min a 96 °C	
Anti-BiP	Monoclonal	Conejo	Abcam,	Citrato pH 6.0,	1:500
	ab108613	IgG	Cambridge, Reino Unido	10 min a 96 °C	
Anti-PDI	Monoclonal	Ratón	SantaCruz	Citrato pH 6.0,	1:200
	F-11(sc-166474)	IgG	Biotechnology, Dallas,Texas EEUU.	10 min a 96 °C	
Anti-Ubiquitin	Polyclonal	Conejo	Abcam,	Citrato pH 6.0,	1:100
	ab7780	IgG	Cambridge, Reino Unido	10 min a 96 °C	
Quinasa del retículo endoplásmico (PERK), Proteína inmunoglobulina de unión (BiP), Proteína disulfuro isomerasa (PDI)					

9.3. Evaluación y cuantificación

Las secciones cerebrales se evaluaron utilizando un microscopio óptico Zeiss Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Alemania). La inmunotinción de BiP, PERK, PDI y Ubiquitina se evaluó a ciegas en las 9 áreas encefálicas mencionadas de los tres grupos de ovejas descritos. Para el análisis de depósito de marcadores de estrés de RE se utilizó la misma escala de puntuación que en estudios anteriores, la cual está basada en una evaluación semicuantitativa del inmunomarcaje de los cuatro marcadores (Otero et al., 2019, 2021; Betancor et al., 2022). Así pues, la inmunotinción se calificó como: 0 (ausencia de inmunotinción), 1 (inmunotinción mínima a leve encontrada en una cantidad reducida de células cerebrales), 2 (inmunotinción leve presente en células de varias áreas de la sección de tejido evaluada), 3 (inmunotinción moderada presente en >50% de las células de la sección de tejido), 4 (inmunotinción intensa observada en >50% de las células de la sección de tejido y varias áreas del neuropilo) o 5 (inmunotinción intensa generalizada en toda la sección, observada en células y el neuro.pilo). Tras esta evaluación semicuantitativa se calcularon las medias de puntuación de cada área encefálica en los tres grupos de ovejas. Dichos resultados se compararon estadísticamente mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, prueba U de Mann-Whitney). La evaluación semicuantitativa de la espongiosis y el depósito de PrP^{Sc} fue realizada en un estudio previo (Betancor et al., 2022) y dichos datos se utilizaron para una prueba de correlación de Spearman. Tanto el test de Mann-Whitney como la prueba de correlación de

Spearman, así como los gráficos con las puntuaciones obtenidas se realizaron utilizando el software GraphPad Prism 6 para Windows.

9.4. Análisis de la expresión génica

El perfil de expresión de los genes de *EIF2AK3*, *HSPA5*, *P4HB*; que codifican las proteínas PERK, BiP y PDI respectivamente, se determinó en muestras de tejido recogidas en RNAlater Solution (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU). Un total de 100 mg de las áreas de corteza frontal, tálamo, hipocampo y médula oblongada se sometieron a extracción de ARN utilizando un kit RNeasy Lipid Tissue Mini (QIAGEN, Venlo, Países Bajos) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se utilizó QScript cDNA Super Mix (Quanta Bioscience™, Beverly, MA, EE.UU.) para obtener ADN complementario (ADNc) a partir de un total de 1µg de ARN. El ADNc resultante se diluyó 1:5 en agua pura para los análisis posteriores. El diseño de los primers para *EIF2AK3*, *HSPA5* y *P4HB* se realizó con el programa Primers3Plus, una herramienta ampliamente utilizada para la selección de primers (Untergasser et al., 2012). Las secuencias, números de acceso y concentraciones de los cebadores utilizados se pueden encontrar en la siguiente tabla.

Tabla 4. Primers utilizados para el estudio genómico

Gen	Secuencias de cebadores y sondas (50,30)	nM	Número de acceso
<i>EIF2AK3</i>	F: AGGTCTCCGTTGCAGATTGG	300	XM_004005901.5
	R: ACTCCATCACTGGGGGTGTA	300	
<i>HSPA5</i>	F: CCCGTGGCATAAACCAGAT	200	XM_004005637.4
	R: GGTCATGACACCTCCCACAG	200	
<i>P4HB</i>	F: TCAGACTCCGCAAAGCAGTT	300	XM_027974277.2
	R: CAAAGTTGTTCCGGCCTTCG	300	
<i>GAPDH</i>	F: TCCATGACCACTTGGCATCGT	900	AF_035421
	R: GTCTTCTGGGTGGCAGTGA	900	
<i>SDHA</i>	F: CATCCACTACATGACGGAGCA	300	AY_970969
	R: ATCTTGCCATCTTCAGTTCTGCTA	300	

Los ensayos cuantitativos en tiempo real (qPCR) se realizaron con el sistema StepONE Real-Time PCR (Termo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU). Las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando un volumen total de 10 µl de solución de reacción que contenía 8 µl de SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, EE.UU.) y 2 µl de ADNc diluido. Cada ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras. Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 3 s y 60 °C durante 30 s. La expresión de los genes housekeeping *GAPDH* y *SDHA* se utilizó para normalizar los resultados, ambos genes fueron descritos como genes de

referencia en la enfermedad de scrapie (Lyahyai et al., 2010). Por último, los análisis de cuantificación de la expresión génica relativa se realizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Los datos se analizaron estadísticamente con el ANOVA unidireccional, con la prueba de comparaciones múltiples *post hoc* de Bonferroni utilizando el software GraphPad Prism 6 para Windows, que también se utilizó para la representación gráfica de los resultados.

RESULTADOS



Los marcadores de estrés del retículo endoplásmico están sobreexpresados en ovejas infectadas con scrapie

10.1 Quinasa del retículo endoplásmico (PERK)

Se observó inmunoreactividad de PERK en los núcleos celulares de neuronas y células gliales en todas las ovejas (clínicas, preclínicas y controles sanos). El mismo patrón fue descrito por Otero et al. (2021) (Figura 4).

La comparación del inmunomarcaje para PERK reveló diferencias significativas entre los grupos. El hipotálamo, el tálamo, corteza parietal y el hipocampo fueron las regiones que mostraron una acumulación más intensa de PERK en las ovejas infectadas con scrapie. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la presencia de células PERK positivas entre ovejas clínicas y sanas en el hipocampo (** $p < 0,01$), hipotálamo, tálamo y corteza parietal (* $p < 0,05$). También se observaron diferencias significativas en la inmunotinción de PERK entre animales preclínicos y sanos en las áreas del hipotálamo y el hipocampo, (* $p < 0,05$), lo que sugiere que la sobreexpresión de PERK en estas áreas comienza durante la fase preclínica de la enfermedad (Figura 5).

La expresión de *EIF2AK3*, el gen que codifica la proteína PERK, se analizó mediante PCR cuantitativa en cuatro áreas cerebrales (médula oblongada, hipocampo, tálamo y corteza frontal) de los tres grupos de ovejas para determinar sus niveles de expresión de ARNm a lo largo del curso de la enfermedad. La figura 6 muestra los valores medios ΔCt de *EIF2AK3*. Aunque no se encontraron

diferencias significativas entre los grupos, en los animales preclínicos podemos observar una tendencia hacia la regulación al alza de *EIF2AK3* en las ovejas preclínicas. En los animales clínicos se observa una tendencia hacia la regulación a la baja de *EIF2AK3*.

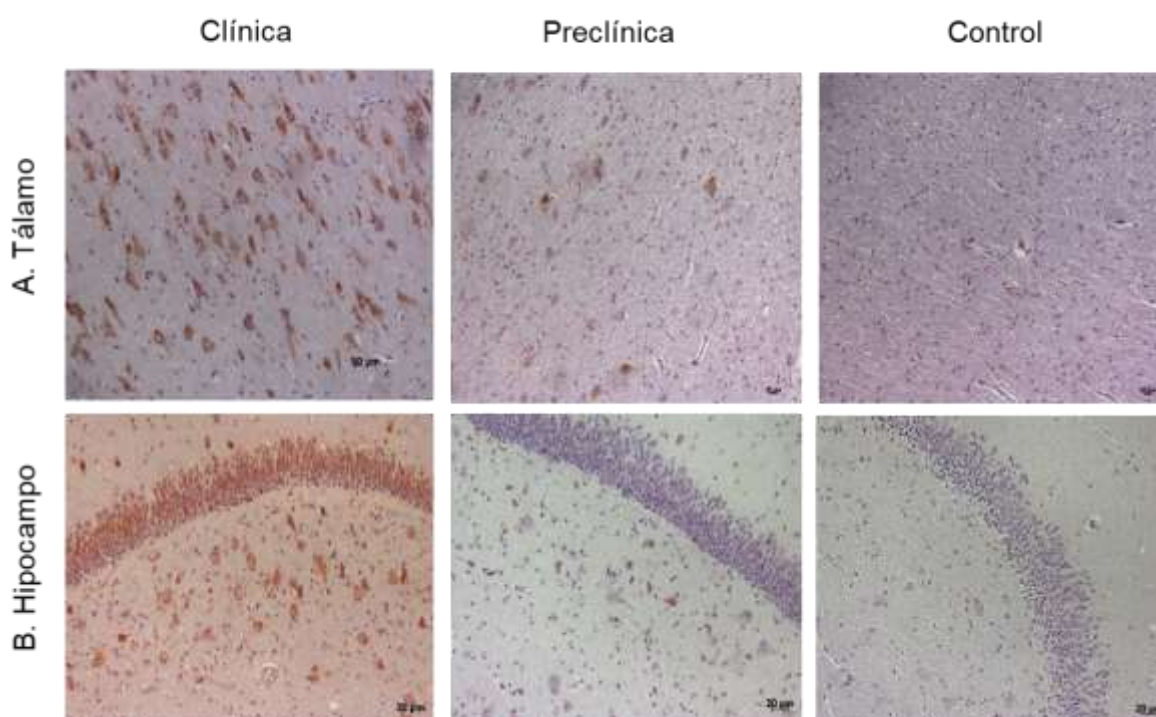


Figura 4. Expresión de la quinasa del retículo endoplásmico (PERK) en el encéfalo de ovejas infectadas con scrapie clínico, preclínico y en ovejas sanas. Se observa un mayor número de células positivas en el animal clínico. A) Detección inmunohistoquímica de PERK en el tálamo. Se detectó inmunotinción positiva para PERK en los núcleos celulares de ovejas clínicas, preclínicas y control. B) Expresión inmunohistoquímica de PERK en las neuronas piramidales de la región hipocampal CA1 de las ovejas clínicas, en las cuales se observa una tinción

intensa. Se aprecia ligera inmunotinción de PERK en las neuronas piramidales de las ovejas preclínica y control.

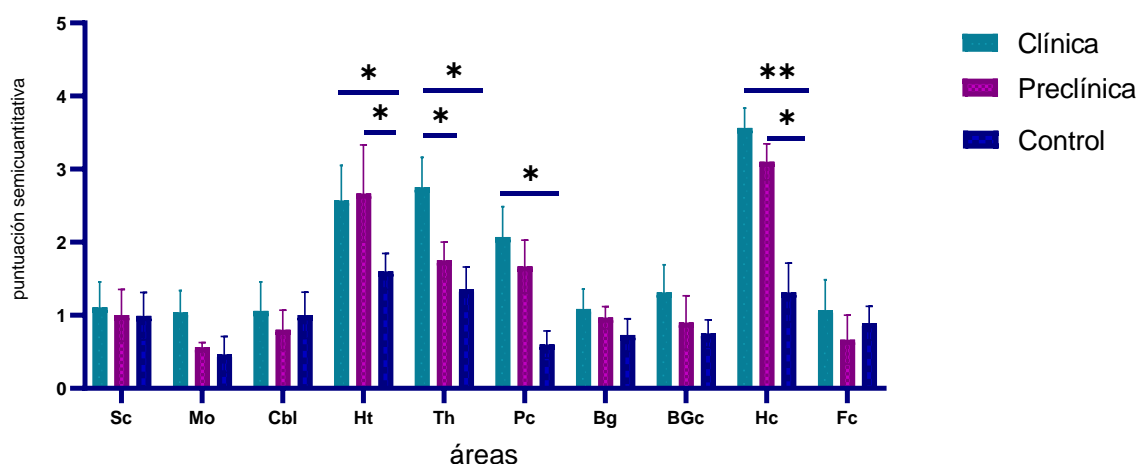


Figura 5. Niveles de expresión de la proteína PERK en 8 animales clínicos, 5 preclínicos y 8 controles evaluados mediante el sistema de puntuación semicuantitativo que establece una puntuación de 0 (ausencia de inmunotinción) a 5 (inmunotinción muy intensa) en nueve áreas cerebrales: (médula espinal (Sc), médula oblongada (Mo), cerebelo (Cbl), hipotálamo (Ht), tálamo (Th), corteza parietal (Pc), ganglios basales (Bg), corteza a nivel de los ganglios basales (BGc), hipocampo (Hc) y corteza frontal (Fc). Las ovejas clínicas mostraron las puntuaciones más altas en el hipocampo, el tálamo e hipotálamo, seguidas de los animales preclínicos con puntuaciones similares en las mismas zonas. La comparación de medias se analizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, prueba U de Mann-Whitney).

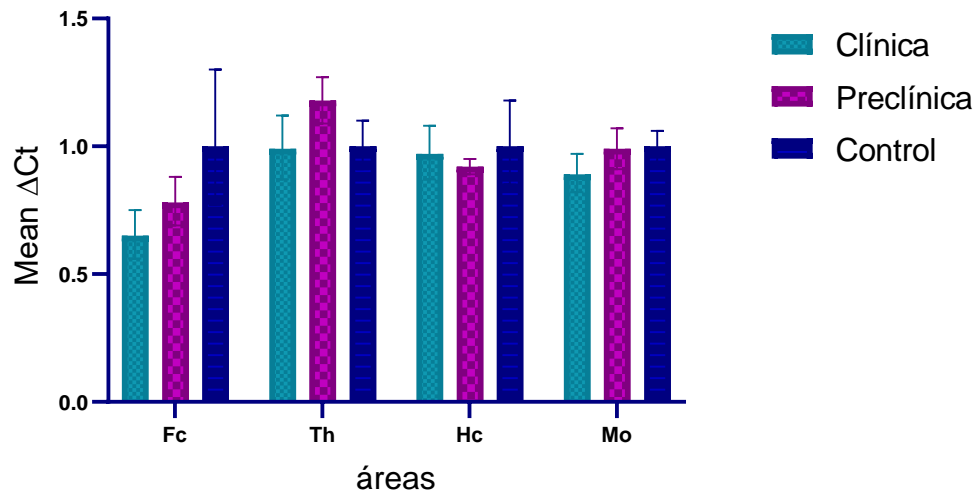


Figura 6. Expresión génica de EIF2AK3 en la corteza frontal, tálamo, hipocampo y médula oblongada de ovejas clínicas, preclínicas y controles sanos. Los genes *SDHA* y *GAPDH* se utilizaron como genes *housekeeping*. Los resultados se expresan como media \pm desviación estándar. Los valores de expresión se determinaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, y las diferencias entre grupos experimentales se analizaron mediante la prueba ANOVA de una vía, seguida de la prueba *post hoc* de Bonferroni. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

10.2 Proteína inmunoglobulina de unión (BiP)

La tinción inmunohistoquímica de BiP muestra depósitos de esta proteína en forma de gránulos en el neuropilo así como una tinción intraneuronal para la proteína en todos los grupos de ovejas (Figura 7). El análisis estadístico mostró que las ovejas clínicas presentaban niveles significativamente más altos de BiP en el tálamo, la corteza parietal (** $p < 0,01$) los ganglios basales, el hipocampo y la corteza frontal (* $p < 0,05$) en comparación con las ovejas sanas. También se observaron diferencias significativas en la corteza parietal entre ovejas clínicas y preclínicas (* $p < 0,05$) (Figura 8). Se realizó una PCR cuantitativa para evaluar la expresión de *HSPA5*, el gen que codifica la proteína BiP, en las cuatro áreas cerebrales utilizadas previamente (Mo, Hc, Th y Fc) en los tres grupos de estudio. La figura 9 representa los valores medios ΔCt de *HSPA5*. Los animales clínicos mostraron una tendencia hacia la regulación a la baja del gen en comparación con los controles en corteza frontal, tálamo e hipocampo. En las ovejas preclínicas encontramos una regulación al alza en la región del tálamo y una regulación a la baja de esta proteína en la corteza frontal. Se detectaron diferencias significativas entre los animales clínicos y preclínicos a nivel del tálamo (**** $p < 0,001$), también diferencias significativas entre clínicos y controles, y entre preclínicos y controles (* $p < 0,05$). En la corteza frontal se detectó una diferencia significativa entre clínicos y preclínicos (* $p < 0,05$) y una diferencia altamente significativa entre clínicos y controles (**** $p < 0,001$).

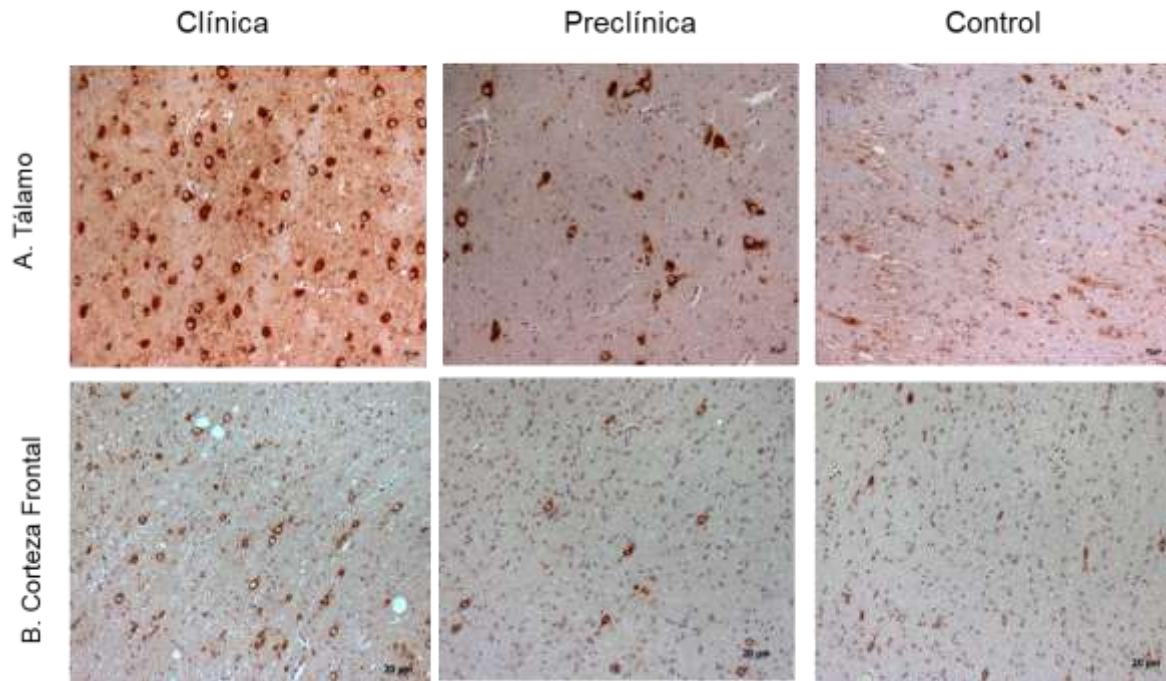


Figura 7. Expresión de la proteína inmunoglobulina de unión (BiP) en ovejas infectadas con scrapie clínico, preclínico y ovejas sanas (control). (A) Imágenes representativas del tálamo. Se observaron depósitos intensos de proteína BiP en el citoplasma de las neuronas de las ovejas clínicas y preclínicas. (B) Expresión de la proteína BiP en las neuronas de la corteza frontal de las ovejas clínicas, preclínicas y control. Se observa un mayor número de células positivas a BiP en el animal clínico.

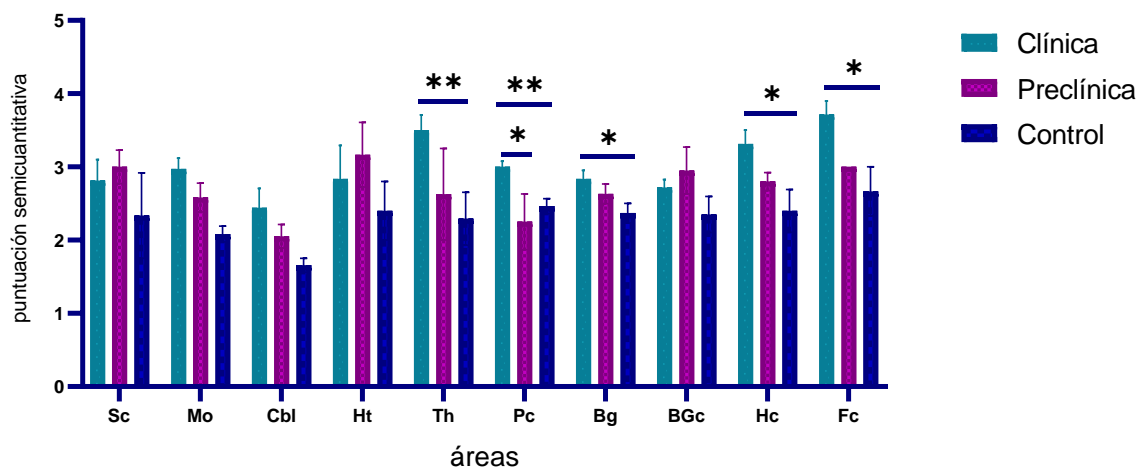


Figura 8. Niveles de expresión de BiP en ocho animales clínicos, cinco preclínicos y ocho controles evaluados mediante el siguiente sistema de puntuación semicuantitativo, una puntuación de 0 (ausencia de inmunotinción) a 5 (inmunotinción muy intensa) en nueve áreas cerebrales: médula espinal (Sc), médula oblongada (Mo), cerebelo (Cbl), hipotálamo (Ht), tálamo (T), corteza parietal (Pc), ganglios basales (Bg), corteza a nivel de los ganglios basales (BGc), hipocampo (Hc) y corteza frontal (Fc). Las ovejas clínicas mostraron una acumulación significativamente mayor de BiP en comparación con los animales preclínicos y control en varias áreas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, prueba U de Mann-Whitney).

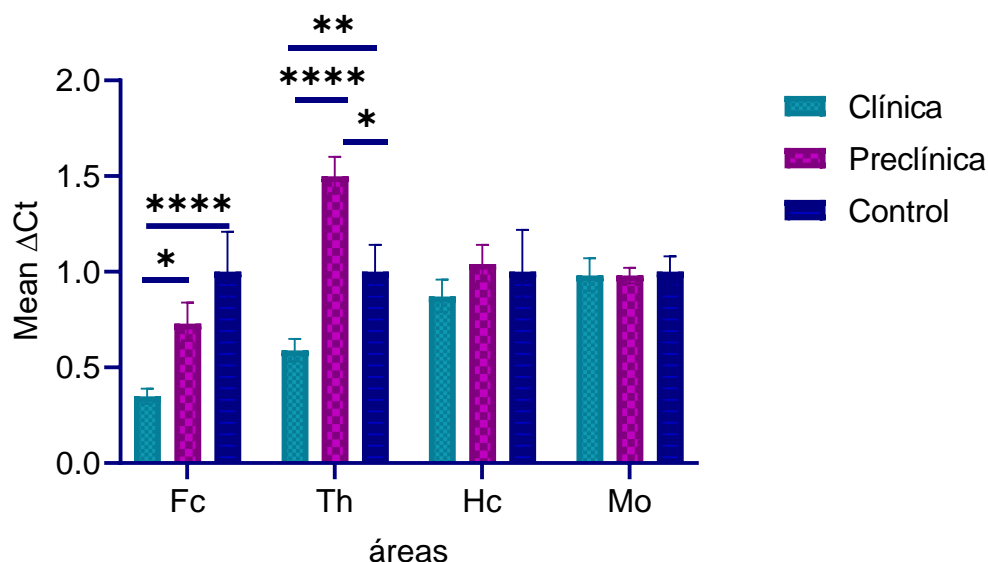


Figura 9. Perfiles de expresión de ARNm del gen HSPA5 en corteza frontal, tálamo, hipocampo y médula oblongada de ovejas clínicas, preclínicas y control. Los niveles de expresión relativos se expresan como la media \pm desviación estándar. Los resultados se normalizaron utilizando la expresión de los genes *SDHA* y *GAPDH* como *housekeeping*. Los valores de expresión se determinaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante la prueba ANOVA unidireccional seguida de la prueba post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$). Se observaron diferencias muy significativas en los niveles de expresión de los distintos grupos de animales en la corteza frontal y tálamo, observándose una reducción de la expresión en animales clínicos.

10.3 Proteína disulfuro isomerasa (PDI)

El patrón de inmunomarcaje de la PDI se caracterizó por tinción intraneuronal y depósitos granulares en el neuropilo en todos los grupos de ovejas (Figura 10). En los animales clínicos, sin embargo, esta inmunotinción fue mucho más intensa (Figura 11). En la médula oblongada, la inmunotinción de PDI se encontró principalmente en el núcleo motor dorsal del vago (DMNX). La comparación del inmunomarcaje de la PDI reveló diferencias significativas entre las ovejas clínicas y las sanas en numerosas áreas cerebrales (médula oblongada, hipotálamo, hipocampo cerebelo, ganglios basales y regiones de la corteza frontal). Los animales preclínicos mostraron una acumulación significativamente mayor de PDI en la médula oblongada y el hipocampo en comparación con los controles. Observamos diferencias significativas de la expresión de la proteína PDI entre las ovejas clínicas y las preclínicas (Figura 12).

La expresión del gen que codifica esta proteína, *P4HB*, se analizó mediante PCR cuantitativa en cuatro áreas cerebrales (médula oblongada, hipocampo, tálamo y corteza frontal) de los tres grupos de ovejas para determinar sus niveles de expresión de ARNm a lo largo del curso de la enfermedad. La figura 13 muestra los valores medios ΔC_t de *P4HB*. En las ovejas preclínicas encontramos una regulación a la baja en el hipocampo y la región de la corteza frontal y una regulación al alza de *P4HB* en el tálamo y la médula oblongada. Los animales clínicos muestran una regulación a la baja en el hipocampo y en la región de la corteza frontal. Los niveles de *P4HB* en la región del tálamo muestran una diferencia significativa entre clínicos y preclínicos, y entre preclínicos y controles

(*p < 0,05), la región del hipocampo muestra una diferencia significativa entre clínicos y controles (*p < 0,05). Asimismo, la región de la corteza frontal muestra una diferencia significativa entre clínicos y controles (*p < 0,05).

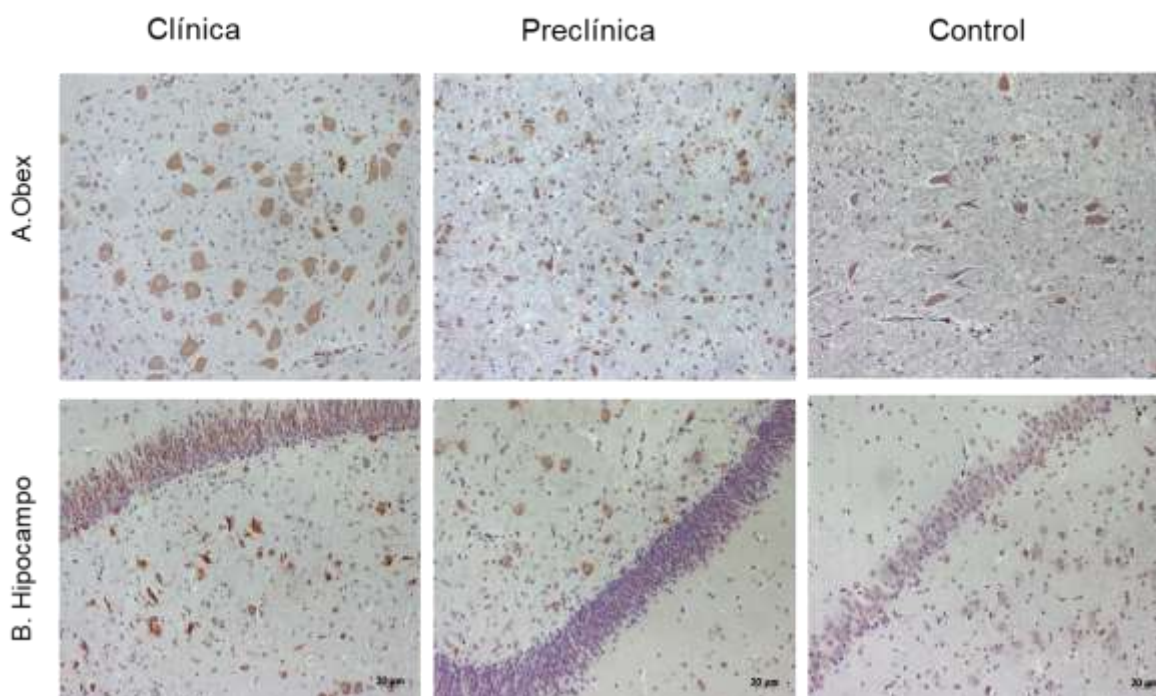


Figura 10. Expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) en ovejas infectadas con scrapie clínico y preclínico y ovejas control sanas. (A) Se observó un fuerte marcaje intraneuronal de PDI en la médula oblongada de los animales clínicos (las imágenes muestran el núcleo motor dorsal del vago (DMNX)). (B) Sobreexpresión de la proteína PDI en el hipocampo de las neuronas de las ovejas clínicas, ligera inmunotinción de PDI en las ovejas preclínicas y escasa inmunotinción en las ovejas control.

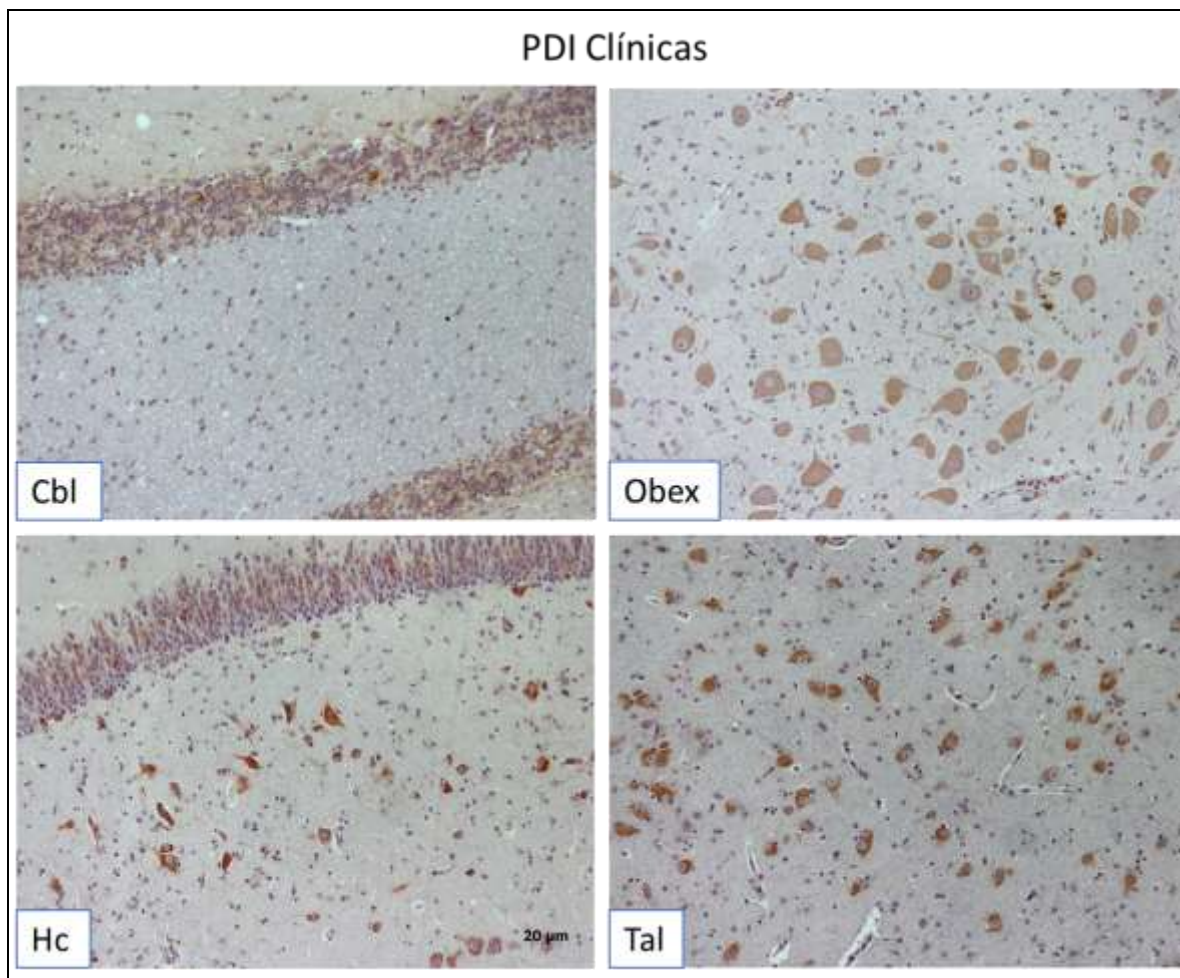


Figura 11. Agregados granulares de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Se observaron agregados granulares de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) dentro del citoplasma de las neuronas en ovejas clínicas en el cerebelo, obex, hipocampo y tálamo. En el cerebelo se observó una mayor inmunotinción en las neuronas de la capa granulosa. El área que mayor inmunotinción presentó en los animales clínicos fue el obex con una fuerte acumulación de PDI intraneuronal. Por otro lado, las neuronas del hipocampo también presentaron una fuerte inmunotinción de PDI así como en el tálamo.

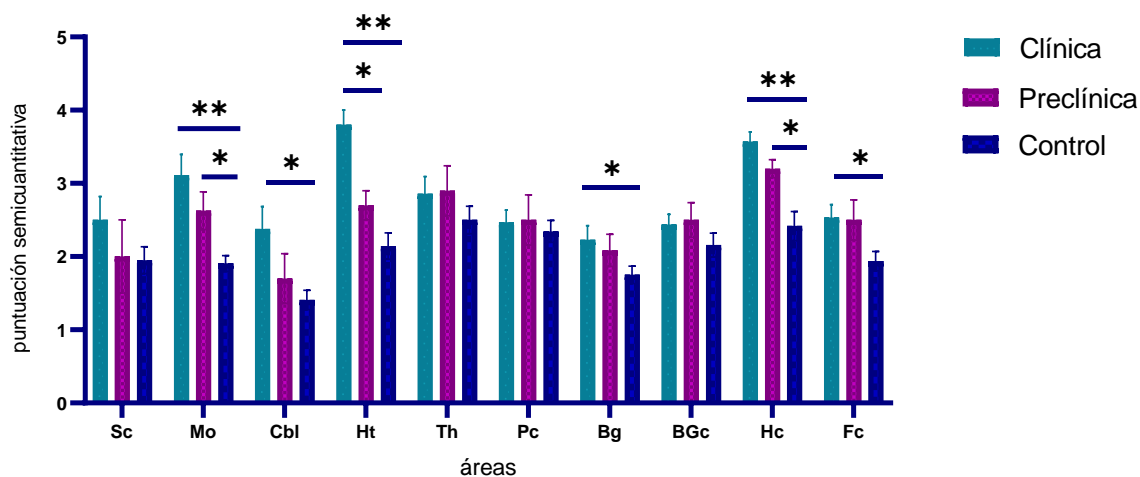


Figura 12. Expresión de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). Los niveles de expresión de la proteína PDI son más intensos en las ovejas clínicas en comparación con los controles en la mayoría de las áreas cerebrales. Los niveles de expresión de la proteína PDI en ocho animales clínicos, cinco preclínicos y ocho controles se evaluaron semicuantitativamente utilizando una escala de: 0 (ausencia de inmunotinción) a 5 (inmunotinción muy intensa) en nueve áreas cerebrales: médula espinal (Sc), médula oblongada (Mo), cerebelo (Cbl), hipotálamo (Ht), tálamo (Th), corteza parietal (Pc), ganglios basales (Bg), corteza a nivel de los ganglios basales (BGc), hipocampo (Hc) y corteza frontal (Fc). Las ovejas clínicas mostraron los niveles más altos de PDI en casi todas las áreas cerebrales evaluadas (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, prueba U de Mann-Whitney).

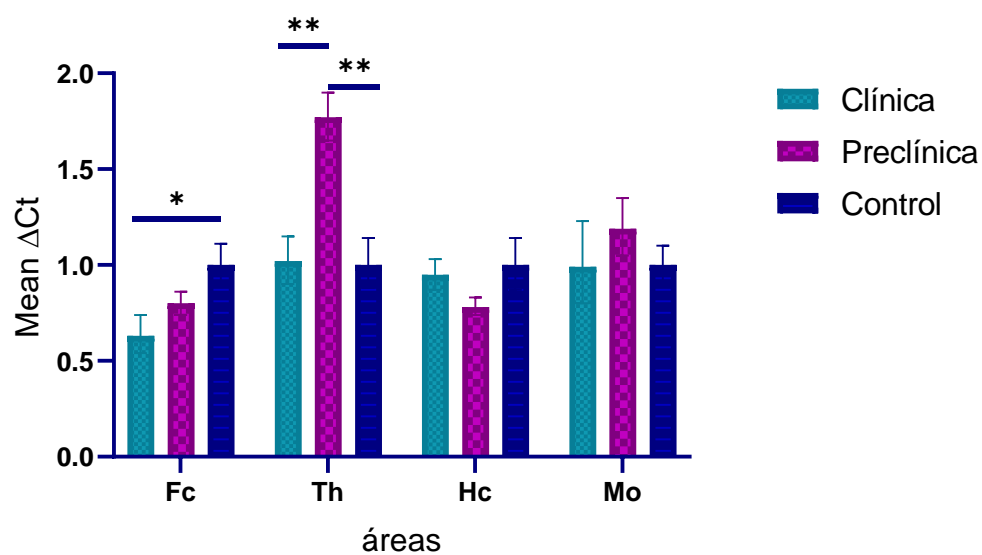


Figura 13. Expresión génica de P4HB en corteza frontal, tálamo, hipocampo y medula oblongada de ovejas clínicas, preclínicas y de control. Los resultados se normalizaron utilizando la expresión de los genes *SDHA* y *GAPDH*. Los valores de expresión se determinaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Las puntuaciones medias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Bonferroni (* $p < 0,05$).

10.4 Ubiquitina

Para determinar si la infección por scrapie causa una alteración del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma se determinó mediante inmunohistoquímica la acumulación de agregados de ubiquitina en el cerebro de ovejas clínicas y preclínicas infectadas por scrapie natural y ovejas sanas. En todos los grupos de animales se encontraron depósitos de ubiquitina intraneuronales y en el neuropilo en forma de gránulos. Sin embargo, las ovejas infectadas con scrapie mostraron mayores niveles de depósitos de ubiquitina en la mayoría de las áreas cerebrales (Figura 14). El análisis estadístico mostró que las ovejas clínicas tenían niveles significativamente más altos de depósitos de ubiquitina en la médula oblongada, los ganglios basales, el hipocampo, la corteza frontal y el tálamo en comparación con los controles. Los animales preclínicos mostraron diferencias significativas con los controles en las mismas zonas, excepto en los ganglios basales. (Figura 15).

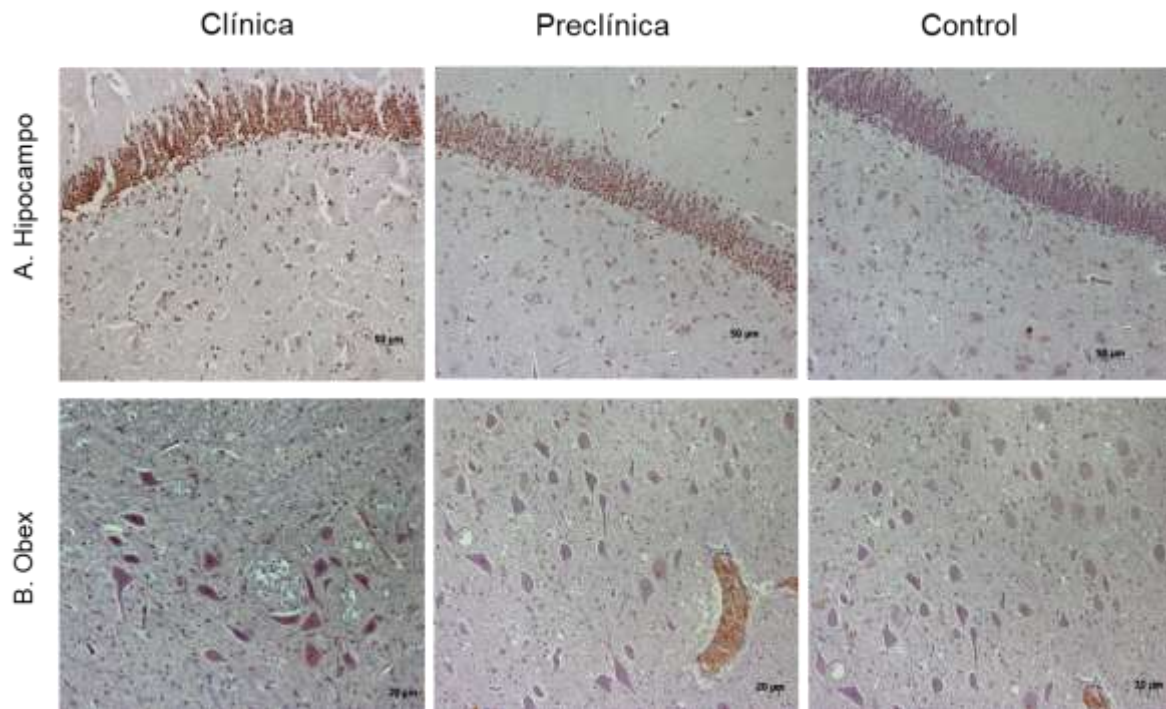


Figura 14. Acumulación de ubiquitina en ovejas infectadas con scrapie clínico y preclínico y en ovejas sanas. (A) Se observan agregados intraneuronales de ubiquitina en el hipocampo. Las regiones CA1-CA2 del hipocampo mostraron la inmunotinción más fuerte para la proteína ubiquitina en ovejas clínicas y preclínicas. (B) Las ovejas clínicas mostraron una mayor cantidad de acúmulos de ubiquitina en el obex en comparación con las preclínicas y controles sanos, las cuales presentaron poca inmunoreactividad en esta zona.

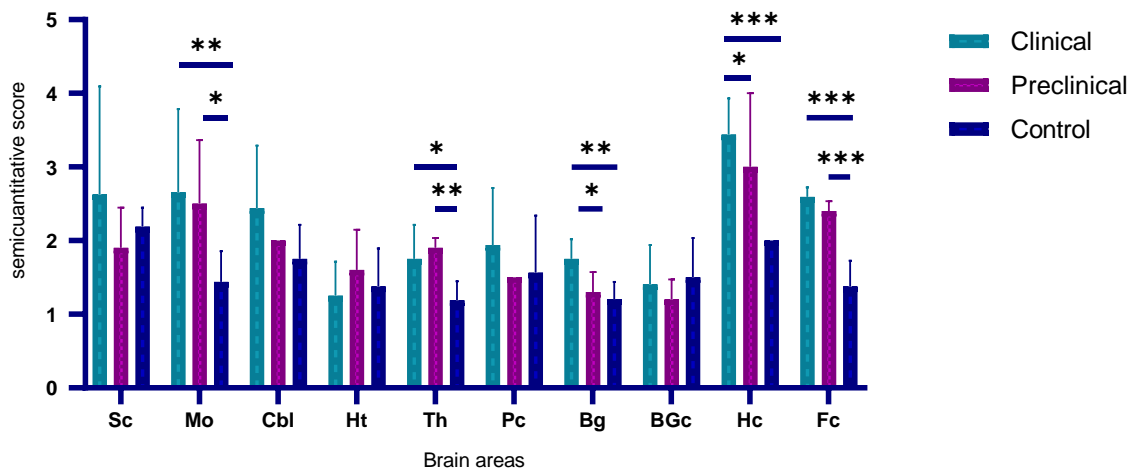


Figura 15. Los niveles de expresión de la proteína ubiquitina en ocho animales clínicos, cinco preclínicos y ocho controles sanos se evaluaron semicuantitativamente utilizando una escala de 0 (ausencia de inmunotinción) a 5 (inmunotinción muy intensa) en nueve áreas cerebrales: médula espinal (Sc), médula oblongada (Mo), cerebelo (Cbl), hipotálamo (Ht), tálamo (Th), corteza parietal (Pc), ganglios basales (Bg), corteza a nivel de los ganglios basales (BGc), hipocampo (Hc) y corteza frontal (Fc). La comparación del inmunomarcaje de ubiquitina reveló diferencias significativas entre las ovejas clínicas y las controles en varias áreas cerebrales. Los animales preclínicos mostraron mayores niveles de acumulación de ubiquitina en la corteza frontal, el tálamo (** $p < 0,01$) la médula oblongada y el hipocampo (* $p < 0,05$) en comparación con los controles. La comparación de medias se analizó mediante la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney).

Correlación entre las proteínas PERK, BiP, PDI y ubiquitina y las lesiones neuropatológicas

Para determinar si existe una posible correlación entre los marcadores de estrés del RE y la alteración del sistema ubiquitina-proteasoma con las lesiones espongiformes (Figuras 16 y 17) y los depósitos de PrP^{Sc} (Figura 18) en ovejas infectadas naturalmente con scrapie se realizó una correlación ρ de Spearman de los valores obtenidos.

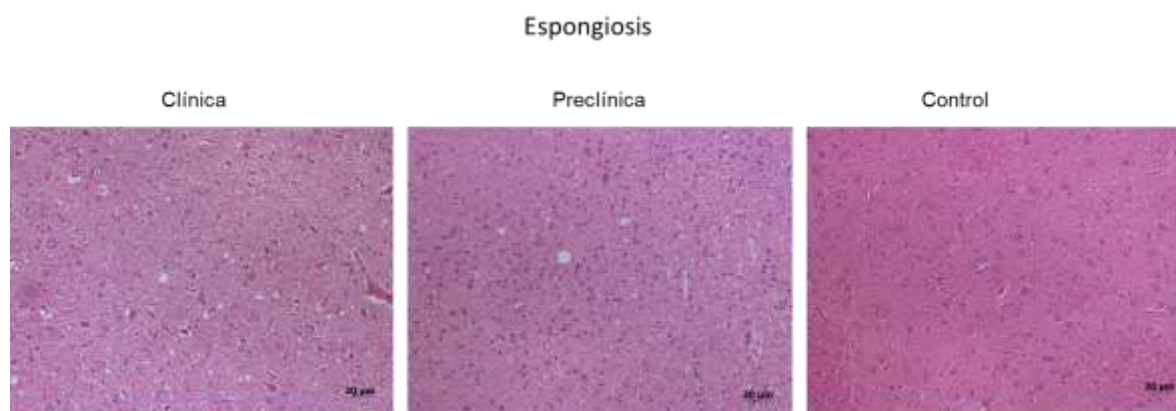


Figura 16. Imágenes representativas de la tinción con hematoxilina y eosina en el tálamo de ovejas clínicas, preclínicas y sanas. En el grupo de animales clínicos se observan las lesiones espongiformes en varias zonas, mientras que en las ovejas preclínicas se observan un menor número de lesiones.

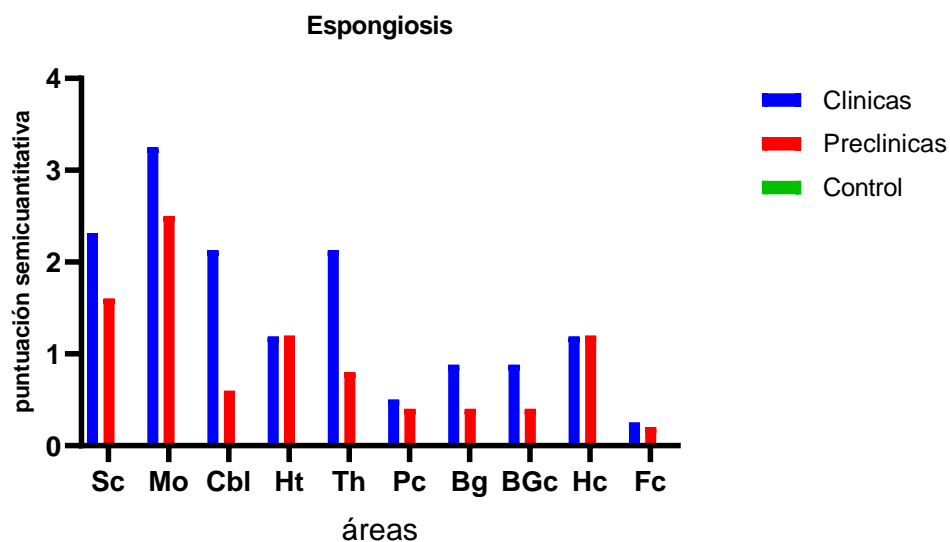


Figura 17. Valores promedio de la valoración semicuantitativa de la presencia de lesiones espongiformes en cada área del encéfalo en una escala de 0 (ausencia de lesiones espongiformes) hasta 5 (espongiosis muy intensa) en ovejas clínicas, preclínicas y controles sanos. La medula oblongada presenta un mayor número de lesiones, seguido de el tálamo y médula espinal. En las ovejas preclínicas también se observan lesiones espongiformes a menor escala. No se observaron lesiones en las ovejas sanas.

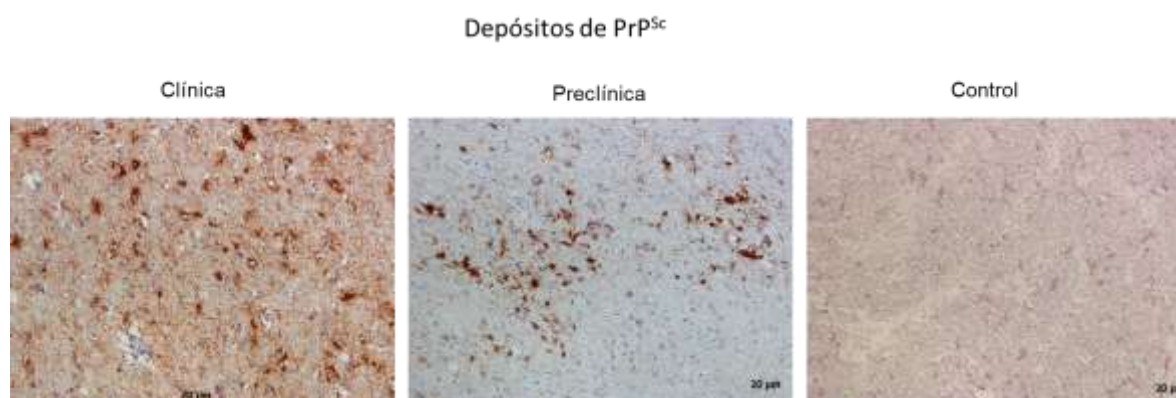


Figura 18. Depósitos de PrP^{Sc} en las ovejas clínicas y preclínicas. No se observan depósitos de esta proteína en las ovejas sanas.

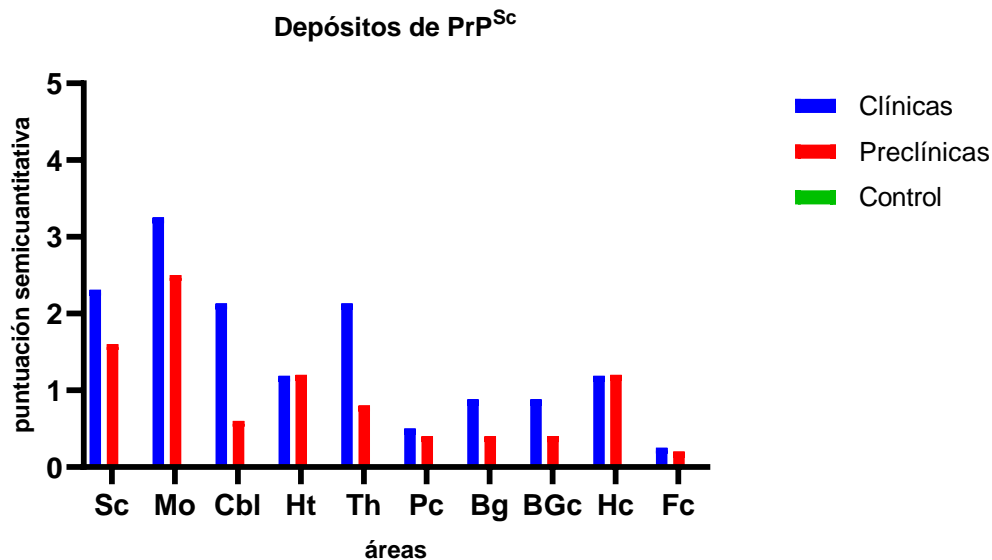


Figura 19. Valores promedio de la valoración semicuantitativa de la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en cada área del encéfalo en una escala de 0 (ausencia de depósitos) hasta 5 (acumulación severa de PrP^{Sc}) en ovejas clínicas, preclínicas y controles sanos. La medula oblongada, tálamo, cerebelo, y médula espinal son áreas donde se evidencian más depósitos de PrP^{Sc}.

Los valores de la correlación de Spearman se detallan en la Tabla 5. La acumulación de marcadores de estrés de RE y ubiquitina mostraron una correlación positiva significativa con la espongiosis y el depósito de PrP^{Sc} en todas las áreas cerebrales estudiadas, excepto en el caso de la proteína PERK, que no se correlacionó con la espongiosis. Entre estos marcadores, PDI y Ubiquitina fueron las proteínas con mayores niveles de correlación con los marcadores neuropatológicos de enfermedad priónica. Nuestros resultados sugieren que la acumulación de las proteínas PDI, Ubiquitina, BiP y PERK está relacionada con los fenómenos neuropatológicos que se desarrollan en el scrapie.

Tabla 5. Valores de correlación de Spearman entre las puntuaciones de los marcadores de estrés del retículo endoplásmico (RE) y deterioro del proteasoma y las lesiones histopatológicas asociadas a priones. Las correlaciones se calcularon utilizando el conjunto completo de datos obtenidos en todas las áreas cerebrales.

	PERK	BiP	PDI	Ubiquitina	Espongiosis	PrP ^{Sc}
PERK		0.2079*	0.3501****	0.06418n.s.	0.1557n.s.	0.2319**
BiP	0.2079*		0.2975***	0.2431**	0.2990**	0.2137*
PDI	0.3501****	0.2975***		0.1486*	0.2534**	0.3545****
Ubiquitina	0.06418n.s.	0.2431**	0.1486*		0.1840*	0.3090***
Espongiosis	0.1557n.s.	0.2990**	0.2534**	0.1840*		0.7373****
PrP ^{Sc}	0.2319**	0.2137*	0.3545****	0.3090***	0.7373****	

PERK: Quinasa del retículo endoplásmico; BiP: Proteína inmunoglobulina de unión
PDI: Proteína disulfuro isomerasa; PrP^{Sc}: Proteína prion patológica. n.s.: diferencia no significativa. Correlación de Spearman * p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 y ****p < 0.0001.

DISCUSIÓN

En los últimos años, se ha sugerido que las alteraciones del RE y el UPS están implicadas en ciertas enfermedades neurodegenerativas, como el Párkinson, el Alzheimer y las enfermedades priónicas, entre otras, las cuales comparten los mismos mecanismos patogénicos basados en la acumulación de proteínas mal plegadas (Ghemrawi and Khair, 2020, Xiang et al., 2017)

En las enfermedades priónicas, las neuronas experimentan "estrés del RE" debido a la acumulación de la proteína prion patológica PrP^{Sc} (Xu and Zhu, 2012). Inmediatamente, las células activan la UPR y la sobreexpresión de chaperonas en respuesta al estrés del RE para ayudar al correcto plegamiento y mantener la homeostasis celular. Si este mecanismo falla, las chaperonas se dirigen a la proteína mal plegada para su degradación a través de la vía UPR (Ciechanover and Kwon, 2017). Sin embargo, el estrés prolongado del RE en las neuronas conduce a la muerte celular produciendo neurodegeneración (Ciechanover and Kwon, 2017, Zheng et al., 2016). Además, se ha observado que en ratones infectados por priones los agregados de PrP^{Sc} provocan una alteración del proteasoma, lo que da lugar a la acumulación de PrP^{Sc} que conduce a la alteración neuronal y eventualmente a la pérdida neuronal extensa (Kristiansen et al., 2007). En 2021, demostramos la sobreexpresión de las chaperonas PERK, BiP y PDI en respuesta al estrés del RE en un modelo espontáneo de enfermedad priónica (Otero et al., 2021). Otros autores también han demostrado que el estrés de RE se desarrolla en cerebros de ratones infectados por priones (Moreno et al., 2012, Hetz et al., 2003, Brown et al., 2005).

En este estudio, investigamos la acumulación de estos marcadores de estrés del RE y evaluamos el deterioro de la actividad del proteasoma en un modelo natural de enfermedad priónica: ovejas infectadas de forma natural por scrapie.

Varios autores han centrado sus estudios en el estrés del RE y la alteración del proteasoma en las enfermedades priónicas, pero los resultados son limitados y contradictorios. Se han estudiado PERK y BiP como marcadores del estrés del RE en tejidos cerebrales de pacientes con ECJ (Costa et al., 2010) y en la enfermedad priónica espontánea en ratones (Otero et al., 2021). Otros estudios mostraron la activación de PERK en tejidos cerebrales de pacientes con Alzheimer, y los autores sugirieron un papel importante para la UPR en las etapas iniciales de la neurodegeneración en esta enfermedad (Hoozemans et al., 2009, Hoozemans et al., 2005).

En este estudio observamos que la expresión de PERK en ovejas infectadas de scrapie aumentó en varias zonas cerebrales, como el hipocampo, el tálamo y el hipotálamo, en comparación con los controles sanos. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos en modelos murinos de enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021). En ratones infectados por priones se ha descrito la regulación al alza de PERK fosforilada en la región del hipocampo, y se ha asociado con un aumento de la forma fosforilada de la subunidad α del factor de iniciación de la traducción eucariótica (eIF2 α -P), lo que conduce a la pérdida neuronal (Moreno et al., 2012). Además, se ha descrito un aumento de PERK, detectado por inmunohistoquímica, en el hipocampo en la enfermedad de

Alzheimer, que afecta especialmente a las neuronas de las regiones CA1 y CA2 (Hoozemans et al., 2005). Esto concuerda con nuestros hallazgos, ya que la mayoría de las células PERK-positivas se encontraron en el asta de Amón, predominantemente en las regiones CA1 y CA2 (Unterberger et al., 2006).

La sobreexpresión de esta proteína también se detectó en el hipocampo y el hipotálamo en ovejas preclínicas en comparación con los controles. En un estudio anterior también se detectó un aumento de PERK durante la fase preclínica de una enfermedad priónica espontánea en ratones (Otero et al., 2021). Estos resultados confirman la activación de la UPR en fases tempranas de las enfermedades neurodegenerativas (Hoozemans et al., 2009).

Aunque no encontramos una correlación entre los niveles de PERK y la intensidad de la espongiosis, la acumulación de PERK mostró una correlación positiva con el depósito de PrP^{Sc} (Tabla 5). La correlación entre los niveles de depósito de PrP^{Sc} y la acumulación de PERK también se detectó en un estudio *ex vivo* de neuronas corticales infectadas por priones, y se asoció a la respuesta celular neuronal temprana del factor de iniciación PERK-eucariota 2 (eIF2 α) (Tanaka et al., 2020). Curiosamente, en este estudio, los autores no encontraron neurodegeneración evidente ni activación de la UPR a través de la vía PERK-eIF2 α , lo que sugiere que la acumulación de priones induce estrés del RE de forma autónoma a las neuronas (Tanaka et al., 2020). La prueba de Spearman mostró también una correlación positiva entre los niveles de PERK y BiP (Tabla 5), como también se observó en un estudio anterior (Otero et al., 2021). En condiciones normales, BiP se une al sensor de estrés PERK, funcionando como detector primario de estrés celular. Cuando se acumulan proteínas mal plegadas, BiP activa la vía PERK, por

lo que la expresión de estas proteínas se correlaciona (Hetz, 2012). Sin embargo, como observamos anteriormente en modelos de enfermedad espontánea, PERK parece estar correlacionada con la patología priónica en ovejas con scrapie natural, pero no tan fuertemente en comparación con los otros marcadores de estrés del RE. Esta conclusión se ve apoyada por nuestros resultados en la expresión del gen *EIF2AK3*, que codifica PERK, ya que no encontramos diferencias significativas en la expresión de *EIF2AK3* entre ovejas infectadas por priones y ovejas sanas. La implicación de la vía PERK-ATF4 en las enfermedades priónicas sigue siendo controvertida. Dependiendo del mecanismo de activación de PERK, esta vía puede tener un papel proadaptativo o proapoptótico. En el papel proadaptativo, la síntesis proteica se suprime para no sobrecargar el RE, a través de un bucle de retroalimentación negativa que activa la vía PERK-ATF4 dando lugar a la expresión de varios genes que codifican las proteínas CHOP y BiP, entre otras, cuya función es la defosforilación de P-eIF2 α para restaurar la síntesis proteica antes de que las neuronas sufran apoptosis (Hetz et al., 2003). Recientemente, se han probado inhibidores de la vía PERK en modelos murinos, pero comprender los mecanismos de regulación de PERK sigue siendo un reto (Moreno et al., 2013). De hecho, los inhibidores de PERK han mostrado efectos neuroprotectores en estudios preclínicos en ratones (Moreno et al., 2013, Radford et al., 2015). Otros autores sugieren que la activación de PERK podría ser beneficiosa (Hoozemans et al., 2009, Bruch et al., 2017). Sin embargo, todo esto sigue siendo cuestionable ya que la activación prolongada de PERK inhibe la síntesis de proteínas y favorece la neurodegeneración (Ohno, 2018). En nuestro estudio, la proteína sensor de estrés PERK aparece correlacionada positivamente

con el depósito de PrP^{Sc}, sin embargo, muestra una débil correlación positiva de Spearman con el resto de marcadores evaluados a excepción de PDI. Estos hallazgos podrían indicar que el mecanismo molecular de regulación de PERK estaría mediado por PDI, siendo indispensable la presencia de esta proteína para permitir la oligomerización y activación de PERK (Kranz et al., 2017). Por otra parte, la activación de la vía PERK puede verse alterada por largos intervalos postmortem que conducen a la desfosforilación de la enzima, como se observa en muestras de pacientes humanos afectados por enfermedades priónicas (Unterberger et al., 2006).

Otro actor importante en el estrés del RE es la chaperona del RE BiP. Se ha descrito que la expresión y actividad de BiP es esencial para la neuroprotección, para prevenir la agregación de proteínas y para regular la correcta señalización de la UPR (Park et al., 2017). Esta función protectora de BiP también se ha descrito en ratones infectados por priones (Park et al., 2017).

Hay informes que revelan aumentos significativos de la chaperona BiP en la enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021), en estudios *in vitro* e *in vivo* en ratones infectados por priones (Park et al., 2017), así como en casos esporádicos de ECJ (Hetz et al., 2003). También se observó una sobreexpresión de esta proteína en modelos de enfermedad de Alzheimer (Roller and Maddalo, 2013). En este estudio, hemos detectado niveles significativamente más altos de BiP en varias áreas cerebrales de las ovejas infectadas, pero estas diferencias sólo se observaron entre el grupo clínico y el control. No se encontraron diferencias significativas en la acumulación de BiP entre los grupos preclínico y control, en contraste con hallazgos previos en ratones transgénicos (Otero et al.,

2021). Sin embargo, los ratones utilizados en dicho estudio desarrollaron una enfermedad priónica espontánea, no una infección priónica natural como las ovejas del presente estudio, y, por tanto, la activación de esta chaperona puede variar en función de la distinta naturaleza de la enfermedad priónica o incluso de la cepa priónica infectante. Otros autores han encontrado una regulación al alza de BiP en la fase terminal del scrapie murino, apoyando esta conclusión (Turano et al., 2002). En este estudio hemos observado un aumento del depósito de la proteína BiP en la corteza frontal y en el tálamo de las ovejas clínicas. En nuestro estudio, hemos analizado la expresión del gen *HSPA5* en cuatro áreas del encéfalo. En la corteza frontal, el tálamo, el hipocampo y la médula oblongada, la expresión del gen *HSPA5* mostró una tendencia a la baja en los animales infectados por priones en comparación con los controles. Sin embargo, en el tálamo, los animales preclínicos mostraron una sobreexpresión significativa de este gen. Otros autores no encontraron una sobreexpresión de este gen en las neuronas talámicas de los ratones infectados por priones (Tanaka et al., 2020). Los estudios en modelos de enfermedad priónica sugieren que el tálamo presenta depósitos de priones antes que la corteza y el hipocampo y se ve afectado más gravemente que otras regiones cerebrales (Carroll et al., 2016, Makarava et al., 2019). Nuestro hallazgo sugiere que la BiP puede desempeñar un papel en la inducción de múltiples mecanismos patogénicos implicados en la neurodegeneración en el scrapie natural y que la respuesta a las proteínas desplegadas es más notable en las áreas cerebrales que muestran una acumulación de PrP^{Sc} más grave. Nuestros resultados mostraron que la proteína BiP estaba positivamente correlacionada con los depósitos de PrP^{Sc} y la

espongiosis en ovejas infectadas por priones. Sin embargo, como se ha visto con PERK, BiP está correlacionada con los cambios neuropatológicos priónicos pero no tan fuertemente en comparación con otros marcadores (Tabla 3). Nosotros, y otros autores, hemos sugerido que la vía PERK-eIF2 α podría no desempeñar un papel crucial en la neurodegeneración de las enfermedades priónicas (Otero et al., 2021, Unterberger et al., 2006). Como se ha observado en estudios anteriores (Otero et al., 2021), la prueba de Spearman confirmó una fuerte correlación entre la expresión de BiP y PDI. Esto podría deberse al hecho de que BiP, como principal regulador de la respuesta a proteínas desplegadas, activa la vía PERK-eIF2-ATF4 que conduce a la muerte celular o activa las ramas de la vía IRE1 o ATF6 como mecanismo de supervivencia celular, lo que favorece la expresión de PDI (Unterberger et al., 2006).

Así, el aumento significativo de PDI en ovejas clínicas favorece la hipótesis de que las vías pro-supervivencia IRE1 o ATF6 se activan para suprimir la acción proapoptótica de PERK. Esta tercera rama de la UPR, dirigida por ATF6, regula la transcripción de genes que favorecen la supervivencia, como GRP78 y 94 y las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) (Roller and Maddalo, 2013). Se ha mencionado que la inhibición de PERK podría ser la clave para evitar la neurodegeneración, y que la reducción en la expresión de BiP acelera la patogénesis de las enfermedades priónicas *in vivo*, lo que sugiere un importante papel protector de esta chaperona evitando la propagación de priones infecciosos (Park et al., 2017).

Varios autores se han centrado en el papel de la proteína disulfuro isomerasa (PDI) en las enfermedades priónicas. Se han observado niveles elevados de PDI en cerebros de pacientes con ECJ esporádica (Yoo et al., 2002) y en modelos murinos de enfermedad priónica (Otero et al., 2021, Wang et al., 2012). Yoo y colaboradores atribuyeron la sobreexpresión de esta proteína a una respuesta de defensa celular contra la acumulación de PrP^{Sc} (Yoo et al., 2002). Varios estudios sobre las chaperonas PDI en enfermedades neurodegenerativas han aportado información valiosa sobre sus mecanismos moleculares de activación y su papel protector frente a la neurotoxicidad inducida por priones (Hetz et al., 2005, Wang et al., 2012). Los ensayos dinámicos de la fluctuación de la PDI en modelos experimentales de scrapie determinaron que la sobreexpresión de la PDI comienza en las fases tempranas de la enfermedad y aumenta de forma persistente hasta las fases posteriores (Wang et al., 2012). Se han detectado altos niveles de Grp58, un miembro de la familia PDI, en muestras humanas de pacientes con ECJ (Hetz et al., 2005). En nuestro estudio, como observamos anteriormente en modelos de enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021), PDI es el marcador de estrés del RE que muestra mayores alteraciones entre los animales infectados por priones que en los animales sanos (Figura 7). Estas diferencias no sólo se detectaron entre animales clínicos y controles. Los animales preclínicos también mostraron un aumento significativo de PDI en comparación con los controles sanos en médula oblongada e hipocampo, lo que parece indicar que los niveles de esta proteína comienzan a aumentar en las primeras fases de la enfermedad, tal y como informan otros autores (Wang et al., 2012).

La prueba de Spearman confirmó una fuerte correlación positiva entre los niveles de PDI y los cambios neuropatológicos. Esto sugiere que la acumulación de agregados de PrP^{Sc} desencadena la regulación positiva de esta chaperona quizás como respuesta neuroprotectora. Sin embargo, también se ha informado de que la PDI y la GRP58 están implicadas en la apoptosis inducida por proteínas mal plegadas (Hoffstrom et al., 2010) y, por tanto, el aumento de PDI observado en este estudio podría estar relacionado con la apoptosis producida por la enfermedad priónica. Además, la PDI muestra una fuerte correlación positiva con los otros marcadores de estrés de RE evaluados. Esto no es sorprendente ya que la PDI es un activador esencial de PERK (Kranz et al., 2017) y trabaja en sinergia con BiP en el correcto plegamiento de las proteínas (Mayer et al., 2000).

Al igual que observamos con el gen *HSPA5*, que codifica BiP, también observamos un aumento significativo del gen *P4HB* (que codifica PDI) en la región del tálamo en animales en fase preclínica. La reducción en la expresión de *P4HB* en la fase final de la enfermedad podría estar relacionada con el desarrollo de la espongiosis, que indica la pérdida neuronal en los animales afectados por scrapie, y fue observada por Hetz y colaboradores en la región talámica de ratones infectados por scrapie (Hetz et al., 2005).

En este estudio, también investigamos el posible papel del deterioro del proteasoma en diferentes etapas de la enfermedad priónica natural mediante el análisis de la acumulación de agregados de ubiquitina en cerebros de ovejas clínicas y preclínicas infectadas con scrapie y en ovejas sanas. Varios estudios en modelos celulares y animales muestran que el deterioro del proteasoma puede ser

importante en la patogénesis de las enfermedades priónicas. En las enfermedades priónicas humanas se ha observado un deterioro de la actividad del proteasoma y un aumento de los niveles de conjugados ubiquitinados (Ironsides et al., 1993), lo cual también se ha observado en cerebros de ratones infectados por priones (Kang et al., 2004, McKinnon et al., 2016), especialmente en la zona talámica en las primeras fases de la enfermedad (McKinnon et al., 2016, Otero et al., 2021). Sin embargo, otros autores no han podido detectar alteraciones en la actividad del UPS *in vivo* (Quaglio et al., 2011).

De forma similar a lo observado con los marcadores de estrés de RE, detectamos acumulación de agregados de ubiquitina en los cerebros de todas las ovejas. Sin embargo, las ovejas clínicas mostraron una acumulación significativamente mayor de esta proteína en numerosas áreas cerebrales en comparación con las ovejas sanas. También se detectaron diferencias en la acumulación de ubiquitina entre el grupo clínico y el preclínico en el hipocampo y los ganglios basales (Figura 11), lo que sugiere que la acumulación de ubiquitina aumenta a medida que progresa la enfermedad en estos animales.

La prueba de correlación de Spearman mostró que la acumulación de ubiquitina se correlacionaba positivamente con las lesiones espongiiformes y los depósitos de PrP^{Sc}, así como con los marcadores de estrés del RE BiP y PDI, pero no con PERK. Podemos sugerir que, en ovejas infectadas naturalmente con scrapie, como se ha descrito previamente en modelos de enfermedad priónica experimental (Axten, 2017) y en modelos de enfermedad priónica espontánea (Otero et al., 2021), se produce una alteración del sistema ubiquitina-proteasoma, que es esencial en la degradación de las proteínas mal plegadas. Se ha descrito

que la PrP^{Sc} inhibe específicamente la subunidad proteolítica β del proteasoma 26S (Kristiansen et al., 2007), lo que puede estar causado por el estrés crónico del RE, ya que las células sometidas a estrés crónico del RE acumulan PrP no translocada en el citosol (Orsi et al., 2006). Curiosamente, en este estudio, al igual que se observó con modelos de enfermedad priónica espontánea, detectamos que ciertas áreas cerebrales, como el tálamo y el hipotálamo, parecen verse afectadas con mayor frecuencia por estos mecanismos que otras áreas cerebrales. Estas respuestas diferenciales al estrés del RE y a la disfunción del proteasoma ya se han descrito anteriormente (Hetz et al., 2005, Stutzbach et al., 2013).

Estas diferencias podrían deberse al hecho de que los depósitos de PrP^{Sc} y la respuesta a estos agregados proteicos es diferente en cada región cerebral, considerando también que la población celular es distinta en cada área cerebral y podría influir en esta respuesta, como se ha demostrado en la neuroinflamación crónica que implica microgliosis reactiva y astrogliosis (Makarava et al., 2019).

Basándonos en los resultados de este estudio, los depósitos ubiquitinados intracelulares detectados en animales preclínicos podrían estar asociados con la agregación temprana de PrP^{Sc}, ya que observamos que la acumulación de ubiquitina se correlaciona fuertemente con la espongiosis y la acumulación de PrP^{Sc}, y la activación de la UPS es indispensable para eliminar los sustratos poliubiquitinados y reducir la carga de PrP^{Sc} (Mckinnon et al., 2016).

Aunque no podemos dilucidar que el estrés del RE o la disfunción del sistema ubiquitina proteasoma desempeñen un papel importante en la patogénesis del scrapie, hemos demostrado que estos fenómenos están presentes durante la

patogénesis de la enfermedad. Nuestros resultados aquí, en ovejas con scrapie natural, son muy similares a los observados en modelos espontáneos de enfermedad priónica.

Sin embargo, las enfermedades priónicas adquiridas de forma natural, espontánea y genética pueden no compartir los mismos mecanismos patogénicos (Quaglio et al., 2011, Mckinnon et al., 2016). Son necesarios más estudios bioquímicos y moleculares en animales que han desarrollado la enfermedad priónica natural para confirmar la implicación del estrés del RE y el mal funcionamiento del proteasoma en la enfermedad priónica natural.

CONCLUSIONES

1. En ovejas que desarrollan scrapie natural el estrés del retículo endoplásmico es un hecho asociado a los fenómenos neuropatológicos y neuroinflamatorios que se desarrollan en las enfermedades priónicas y se detecta sólo en ciertas áreas encefálicas.
2. Los depósitos de PERK en los encéfalos de ovinos con scrapie confirman la activación de la respuesta a proteínas desplegadas en fases tempranas de la enfermedad. Las ovejas preclínicas manifestaron agregados proteicos de este marcador en el hipocampo, tálamo e hipotálamo lo puede indicar daños patológicos tempranos en estas áreas.
3. Existe una sobreexpresión de la chaperona BiP en la enfermedad priónica natural, esencial para la neuroprotección y la correcta activación de los procesos para el control de proteínas mal plegadas.
4. La sobreexpresión del gen *HSPA5*, que codifica la proteína BiP, y del gen *P4HB*, que codifica la proteína PDI, comienzan en la fase preclínica de la enfermedad, y posteriormente disminuyen su expresión en la fase clínica, lo cual puede estar asociado a la pérdida neuronal que se produce en el transcurso de la enfermedad.

5. PDI es el marcador de estrés del RE que muestra mayores alteraciones entre los animales infectados por priones y los sanos. La acumulación de la proteína comienza en la fase preclínica de la enfermedad y continúa incrementando hasta la fase clínica.
6. La acumulación significativamente mayor de agregados de ubiquitina en los animales afectados por scrapie sugiere un deterioro del sistema ubiquitina-proteasoma en esta enfermedad.

7. En ovejas que desarrollan scrapie natural el estrés del retículo endoplásmico es un hecho asociado a los fenómenos neuropatológicos y neuroinflamatorios que se desarrollan en las enfermedades priónicas y se detecta sólo en ciertas áreas encefálicas.
8. Los depósitos de PERK en los encéfalos de ovinos con scrapie confirman la activación de la respuesta a proteínas desplegadas en fases tempranas de la enfermedad. Las ovejas preclínicas manifestaron agregados proteicos de este marcador en el hipocampo, tálamo e hipotálamo lo puede indicar daños patológicos tempranos en estas áreas.
9. Existe una sobreexpresión de la chaperona BiP en la enfermedad priónica natural, esencial para la neuroprotección y la correcta activación de los procesos para el control de proteínas mal plegadas.
10. La sobreexpresión del gen *HSPA5*, que codifica la proteína BiP, y del gen *P4HB*, que codifica la proteína PDI, comienzan en la fase preclínica de la enfermedad, y posteriormente disminuyen su expresión en la fase clínica, lo cual puede estar asociado a la pérdida neuronal que se produce en el transcurso de la enfermedad.

11. PDI es el marcador de estrés del RE que muestra mayores alteraciones entre los animales infectados por priones y los sanos. La acumulación de la proteína comienza en la fase preclínica de la enfermedad y continúa incrementando hasta la fase clínica.
12. La acumulación significativamente mayor de agregados de ubiquitina en los animales afectados por scrapie sugiere un deterioro del sistema ubiquitina-proteasoma en esta enfermedad.

RESUMEN



Los priones son agentes infecciosos causantes de trastornos neurodegenerativos mortales denominados enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) que afectan tanto a animales como a seres humanos. Las EET se caracterizan por la acumulación en el Sistema Nervioso Central (SNC) de la proteína priónica patológica (PrP^{Sc}), una isoforma anormal de una glicoproteína de membrana fisiológica denominada proteína priónica celular (PrP^C).

La acumulación crónica de proteínas mal plegadas, como la PrP^{Sc}, puede alterar la homeostasis del retículo endoplásmico (RE) y desencadenar la respuesta a proteínas mal plegadas. En este hecho patogénico, las chaperonas moleculares desempeñan un papel importante y están sobreexpresadas en las enfermedades priónicas. Varios estudios en humanos y animales han sugerido que la neurodegeneración está relacionada con el estrés del RE en enfermedades causadas por la acumulación de proteínas mal plegadas. Esta situación activa una red de señalización prosupervivencia denominada respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) que provoca la sobreexpresión de chaperonas y foldasas del RE y la reducción de la traducción de proteínas.

Por lo tanto, el objetivo principal de este estudio fue evaluar la presencia de las proteínas PERK (quinasa del retículo endoplásmico), BiP (proteína inmunoglobulina de unión) y PDI (proteína disulfuro isomerasa) como biomarcadores potenciales de estrés del RE en tejido cerebral y la presencia de depósitos ubiquitinados que sugieren un deterioro del sistema ubiquitina-

proteasoma en ovejas infectadas naturalmente con scrapie. La presencia de estas proteínas se evaluó mediante el estudio inmunohistoquímico en tejido cerebral de ovejas afectadas por scrapie en estadio clínico, y preclínico de la enfermedad. Los resultados se compararon con los observados en controles sanos. Además, se analizó la expresión de los genes de *EIF2AK3*, *HSPA5*, *P4HB*; que codifican las proteínas PERK, BIP y PDI respectivamente.

PERK es una de las principales proteínas sensoras que activan la UPR. Durante la patogénesis del estrés del RE, la fosforilación de PERK reduce la síntesis de proteínas y reduce la carga de proteínas mal plegadas en el RE. En este estudio, el depósito de esta proteína se observó en las neuronas de todas las ovejas, con mayor inmunorreactividad en las ovejas clínicas. Se observaron diferencias significativas entre animales clínicos y sanos, así como entre los animales preclínicos y sanos. Las regiones encefálicas que mostraron una acumulación mayor de PERK en los animales preclínicos fueron el hipotálamo, tálamo e hipocampo, lo cual puede indicar un daño neuropatológico en las primeras etapas de la enfermedad en estas áreas. En el estudio de expresión génica no se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales, sólo se pudo observar una tendencia hacia la regulación al alza de *EIF2AK3* en las ovejas preclínicas, mientras que en los animales clínicos se observa una tendencia hacia la regulación a la baja. Por otro lado, en el estudio de correlación con el resto de marcadores, PERK solo muestra una correlación positiva de Spearman con PDI, lo que podría indicar que la activación y regulación de PERK estaría mediada por PDI.

Otro actor importante en el estrés del RE es BiP, una chaperona del RE y un sensor primario en la activación de la UPR. Las proteínas mal plegadas se unen a BiP, que actúa como sensor de estrés del RE cuando PERK desconecta a BiP de su ciclo de chaperona y participa en el plegamiento correcto de la PrP^C. La sobreexpresión de BiP disminuye la propagación del prion, por lo que una reducción en la expresión de esta chaperona molecular acelera la patogénesis de la enfermedad. En nuestro estudio las ovejas clínicas mostraron niveles significativamente más altos de BiP que los animales sanos en casi todas las áreas cerebrales evaluadas, siendo más evidente en la región del tálamo, ganglios basales, hipocampo y corteza frontal. El estudio de la expresión del gen *HSPA5*, que codifica la proteína BiP, mostró una tendencia hacia la regulación a la baja en los animales clínicos que podría estar relacionada con la apoptosis que sufren las células.

El papel de las chaperonas moleculares es clave en el plegamiento de la PrP, por lo que los miembros de la familia de las PDI desempeñan un papel importante en los animales infectados por enfermedades priónicas. Las chaperonas PDI son responsables de catalizar la formación, reducción e isomerización de los enlaces disulfuro de las proteínas y juegan un papel importante en asegurar el control de calidad en la vía de maduración de la PrP. La PDI se sobreexpresa en cerebros de pacientes con enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica y en tejidos cerebrales de hámsters infectados con priones. Además, desempeña diferentes funciones durante la patogénesis de la enfermedad. En este estudio, se observó depósito intraneuronal y depósitos granulares de PDI en el neuropilo de todos los grupos de ovejas. La comparación del inmunomarcaje de la PDI reveló diferencias

significativas entre las ovejas clínicas y las sanas en numerosas áreas cerebrales (médula oblongada, hipotálamo, hipocampo cerebelo, ganglios basales y corteza frontal). Los animales preclínicos mostraron una acumulación significativamente mayor de PDI en médula oblongada e hipocampo en comparación con los controles. En el estudio de expresión génica de *P4HB* se observó regulación a la baja en el hipocampo y la región de la corteza frontal en los animales preclínicos y una regulación al alza de *P4HB* en el tálamo y la médula oblongada. Los animales clínicos muestran una regulación a la baja en el hipocampo y en la región de la corteza frontal. Se ha descrito que, en las primeras fases de la enfermedad, la sobreexpresión de PDI tiene una actividad protectora, eliminando las proteínas mal plegadas. En las fases avanzadas, la actividad de la PDI puede inducir estrés oxidativo y desencadenar la apoptosis.

La función principal de la UPR es reducir la carga de proteínas mal plegadas y mantener la homeostasis en el RE. La sobreactivación de la UPR en las células desempeña un papel neuroprotector en las enfermedades priónicas. El sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) participa en la degradación de proteínas residentes o anómalas que se acumulan en el RE. Las proteínas mal plegadas son marcadas por moléculas de ubiquitina y degradadas por el proteasoma. Si esta degradación no tiene éxito, los agregados de ubiquitina se acumulan y la célula sufre apoptosis. Para determinar si la infección por scrapie provoca una alteración del sistema de degradación ubiquitina-proteasoma, se determinó mediante inmunohistoquímica la acumulación de agregados de ubiquitina en el cerebro de ovejas clínicas y preclínicas y se compararon los resultados con los obtenidos en ovejas sanas. En todos los grupos de animales se encontraron depósitos de ubiquitina

intraneuronales y en el neuropilo en forma de gránulos. Sin embargo, las ovejas infectadas con scrapie mostraron mayores niveles de depósitos de ubiquitina en la mayoría de las áreas cerebrales, específicamente en la médula oblongada, los ganglios basales, el hipocampo, la corteza frontal y el tálamo en comparación con los controles. Los animales preclínicos mostraron diferencias significativas con los controles en las mismas zonas, excepto en los ganglios basales. Se pudo observar depósitos de esta proteína en las regiones CA1-CA2 del hipocampo en ovejas clínicas y preclínicas.

Mediante la evaluación de los cuatro marcadores de estrés del retículo endoplásmico se ha podido determinar la participación de estas chaperonas en los procesos neurodegenerativos que ocurren durante el scrapie natural. Asimismo, en la patogenia de la enfermedad también se produce una disfunción del sistema ubiquitina-proteasoma.

ABSTRACT

Prions are infectious agents that cause fatal neurodegenerative disorders called prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) that affect both animals and humans. TSEs are characterized by the accumulation in the central nervous system (CNS) of the pathological prion protein (PrP^{Sc}), an abnormal isoform of a physiological membrane glycoprotein called cellular prion protein (PrP^{C}).

Chronic accumulation of misfolded proteins, such as PrP^{Sc} , can alter endoplasmic reticulum (ER) homeostasis and trigger the response to misfolded proteins. In this pathogenic event, molecular chaperones play an important role and are overexpressed in prion diseases. Several human and animal studies have suggested that neurodegeneration is related to ER stress in diseases caused by the accumulation of misfolded proteins. This situation activates a prosurvival signaling network called the misfolded protein response (UPR) that leads to overexpression of ER chaperones and foldases and reduces protein translation.

Therefore, the main objective of this study was to evaluate the presence of PERK (endoplasmic reticulum kinase), BiP (immunoglobulin-binding protein) and PDI (protein disulfide isomerase) proteins as potential biomarkers for ER stress in brain tissue and the presence of ubiquitinated deposits suggesting an impairment of the ubiquitin-proteasome system in sheep naturally infected with scrapie. The presence of these proteins was evaluated by immunohistochemistry in brain tissue

from scrapie-affected sheep at clinical and preclinical stages of the disease. The results were compared with those observed in healthy controls. In addition, the expression of *EIF2AK3*, *HSPA5*, and *P4HB* genes, encoding PERK, BIP and PDI proteins, respectively, was analyzed.

PERK is one of the major sensor proteins that activate the UPR. During the pathogenesis of ER stress, phosphorylation of PERK reduces both protein synthesis and the load of misfolded proteins in the ER. In this study, deposition of this protein was observed in neurons of all sheep, with higher immunoreactivity in clinical sheep. Significant differences were observed between clinical and healthy animals, as well as in preclinical and healthy animals. The encephalic regions that showed a higher accumulation of PERK in preclinical animals were the hypothalamus, thalamus and hippocampus, which may indicate neuropathological damage in the early stages of the disease in these areas. In the gene expression study, no significant differences were observed between the groups of animals, only in the preclinical animals a tendency towards up-regulation of *EIF2AK3* could be observed in the preclinical sheep, while in the clinical animals a tendency towards down-regulation was observed. On the other hand, in the correlation study with the rest of the markers, PERK only shows a positive Spearman correlation with PDI, which could indicate that PERK activation and regulation could be mediated by PDI.

Another important player in ER stress is BiP, an ER chaperone and a primary sensor in UPR activation. Misfolded proteins bind to BiP, which acts as an ER

stress sensor when PERK disconnects BiP from its chaperone cycle and participates in the correct folding of PrP^C. Overexpression of BiP decreases prion propagation, so a reduction in the expression of this molecular chaperone accelerates disease pathogenesis. In our study, clinical sheep showed significantly higher levels of BiP than healthy animals in almost all brain areas evaluated, being more evident in the regions of thalamus, basal ganglia, hippocampus and frontal cortex. The study of the expression of the *HSPA5* gene encoding the BiP protein showed a tendency towards down-regulation in clinical animals that could be related to the apoptosis that cells undergo after this pathological event.

The role of molecular chaperones is key in PrP folding, so members of the PDI family play an important role in animals infected with prion diseases. PDI chaperones are responsible for catalyzing the formation, reduction and isomerization of protein disulfide bonds and play an important role in ensuring quality control in the PrP maturation pathway. PDI is overexpressed in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and in brain tissues of prion-infected hamsters. In addition, it plays different roles during prion pathogenesis. In this study, PDI accumulation by immunohistochemistry was characterized by intraneuronal staining and granular deposits in the neuropil in all groups of sheep. Comparison of PDI immunolabeling revealed significant differences between clinical and healthy sheep in numerous brain areas (medulla oblongata, hypothalamus, hippocampus cerebellum, basal ganglia and frontal cortex). Preclinical animals showed significantly higher accumulation of PDI in medulla oblongata and hippocampus compared to controls. Down-regulation of *P4HB* was

observed in the hippocampus and frontal cortex in preclinical animals and an up-regulation was observed in thalamus and medulla oblongata. Clinical animals showed a down-regulation of this gene in the hippocampus and frontal cortex region. It has been described that, in the early stages of the disease, PDI overexpression has a protective activity, eliminating misfolded proteins. In advanced stages, PDI activity can induce oxidative stress and trigger apoptosis.

The main function of the UPR is to reduce the misfolded protein load and maintain the homeostasis in the ER. Activation of the UPR in cells plays a neuroprotective role in prion diseases. The ubiquitin-proteasome system (UPS) is involved in the degradation of resident or abnormal proteins that accumulate in the ER. Misfolded proteins are tagged by ubiquitin molecules and degraded by the proteasome. If this degradation is unsuccessful, ubiquitin aggregates accumulate and the cell undergoes apoptosis. To determine whether scrapie infection causes an alteration of the ubiquitin-proteasome degradation system, the accumulation of ubiquitin aggregates in the brain of clinical and preclinical sheep was determined by immunohistochemistry and the results were compared with those obtained in healthy sheep. Intraneuronal ubiquitin deposits and granular deposits in the neuropil were found in all groups of animals. However, scrapie-infected sheep showed higher levels of ubiquitin deposits in most brain areas, specifically in the medulla oblongata, basal ganglia, hippocampus, frontal cortex and thalamus compared to controls. Preclinical animals showed significant differences with controls in the same areas, except in the basal ganglia. Deposits of this protein

could be observed in the CA1-CA2 regions of the hippocampus in clinical and preclinical sheep.

Through the evaluation of these four markers of endoplasmic reticulum stress we have determined the participation of these chaperones in the neurodegenerative processes of natural scrapie. Likewise, in the pathogenesis of the disease there is also a dysfunction of the ubiquitin-proteasome system.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de tinción con Hematoxilina-Eosina

- Desparafinado. Inmersión de los tejidos en los siguientes reactivos:

1. Xilol: 4 min
2. Xilol: 4 min
3. Alcohol 100°: 4 min
4. Alcohol 100°: 4 min
5. Alcohol 96°: 1 min
6. Alcohol 70°: 1 min
7. Agua corriente: 1 min

- Tinción. Inmersión de los tejidos en los siguientes reactivos:

1. Hematoxilina: 5 min
2. Agua corriente: 1 min
3. Alcohol ácido: 2 min
4. Eosina: 2 min
5. Agua: 3 inmersiones de 1-2''

- Deshidratación y montaje:

1. Alcohol 100°: 1 min
2. Alcohol 100°: 1 min
3. Xilol: 1 min
4. Xilol: 5 min (mínimo)
5. Montaje de la muestra en Dibutyl phthalate Poliestireno Xileno (DPX)

Anexo 2. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína PERK

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

-Desparafinado:

1. Xilol: 5 min
2. Xilol: 5 min
3. Alcohol 100°: 5 min
4. Alcohol 100°: 5 min
5. Alcohol 96°: 3 min
6. Alcohol 70°: 3 min

Lavar 2x5 minutos con H₂O

-Desenmascarado de epítomos:

1. Autoclavado hidratado con tampón citrato: 10 min a 96°C

-Inmunodetección

1. Bloquear la peroxidasa endógena utilizando la solución de bloqueo (kit Envision-DAB.

DAKO, Dinamarca) durante 5 min

Lavar 3 veces con TBST

Incubar con anticuerpo primario anti-PERK (Abcam, Cambridge, United Kingdom)

1:250 durante 1h.

Lavar 3 veces con TBST

Incubar con el polímero marcador Envision “anti-rabbit” (Dako, Glostrup, Denmark)

(kit Envision DAB,

DAKO) durante 30 min

Lavar 3 veces con TBST

- Teñir las muestras con DAB durante unos minutos
- Parar la reacción con agua destilada
- Contrateñir con hematoxilina 5 min y lavar con agua destilada
- Lavar con agua destilada
- Deshidratación y montaje

Anexo 3. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína BIP

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

-Desparafinado:

1. Xilol: 5 min
2. Xilol: 5 min
3. Alcohol 100º: 5 min
4. Alcohol 100º: 5 min
5. Alcohol 96º: 3 min
6. Alcohol 70º: 3 min

Lavar 2x5 minutos con H₂O

-Desenmascarado de epítomos:

1. Autoclavado hidratado con tampón citrato: 10 min a 96°C

-Inmunodetección

1. Bloquear la peroxidasa endógena utilizando la solución de bloqueo (kit Envision-DAB.

DAKO, Dinamarca) durante 5 min

2. Lavar 3 veces con TBST

Incubar con anticuerpo primario GRP78-BiP (Abcam, Cambridge, United kingdom) 1:500 durante 1h.

3. Lavar 3 veces con TBST

4. Incubar con el polímero marcado Envision “anti-rabbit” (Dako, Glostrup, Denmark) (kit Envision DAB, durante 30 min

5. Lavar 3 veces con TBST

6. Teñir las muestras con DAB durante unos minutos

7. Parar la reacción con agua destilada

8. Contrateñir con hematoxilina 5 min y lavar con agua destilada

9. Lavar con agua destilada

-Deshidratación y montaje

Anexo 4. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína PDI

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

Desparafinado:

1. Xilol: 5 min
2. Xilol: 5 min
3. Alcohol 100º: 5 min
4. Alcohol 100º: 5 min
5. Alcohol 96º: 3 min
6. Alcohol 70º: 3 min

Lavar 2x5 minutos con H₂O

-Desenmascarado de epítomos:

- Autoclavado hidratado con tampón citrato: 10 min a 96°C

-Inmunodetección

-Bloquear la peroxidasa endógena utilizando la solución de bloqueo (kit Envision-DAB.

DAKO, Dinamarca) durante 5 min y lavar 3 veces con TBST

-Incubar con anticuerpo primario anti-PDI (Santa Cruz Biotechnology) 1:200 durante 1h, lavar 3 veces con TBST

-Incubar con el polímero marcado Envision “goat anti-mouse” (kit Envision DAB, DAKO) durante 30 min

- Lavar 3 veces con TBST
- Teñir las muestras con DAB durante unos minutos
- Parar la reacción con agua destilada
- Contrateñir con hematoxilina 5 min y lavar con agua destilada
- Lavar con agua destilada
- Deshidratación y montaje

Anexo 5. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína Ubiquitina

Mantener las muestras a 60°C un mínimo de 30 minutos antes de empezar la técnica.

-Desparafinado:

1. Xilol: 5 min
2. Xilol: 5min
3. Alcohol 100º: 5 min
4. Alcohol 100º: 5 min
5. Alcohol 96º: 3 min
6. Alcohol 70º: 3 min y lavar 2 veces x5 minutos con H₂O_d

- Desenmascarado de epítomos:
- Autoclavado hidratado con tampón citrato: 10 min a 96°C
- Inmunodetección
- Bloquear la peroxidasa endógena utilizando la solución de bloqueo (kit Envision-DAB.
- DAKO, Dinamarca) durante 5 min
- Lavar 3 veces con TBST
- Incubar con anticuerpo primario anti-ubiquitina (Abcam, Cambridge, United Kingdom) 1:100 durante 1h y lavar 3 veces con TBST
- Incubar con el polímero marcado Envision “goat anti-mouse” (kit Envision DAB,
- DAKO) durante 30 min
- Lavar 3 veces con TBST
- Teñir las muestras con DAB durante unos minutos y parar la reacción con agua destilada
- Contrateñir con hematoxilina 5 min y lavar con agua destilada
- Lavar con agua destilada
- Deshidratación y montaje

Anexo 6. Técnica de inmunohistoquímica para la detección de PrP^{Sc}

Cortar las secciones (4 µm) y recogerlas sobre portaobjetos tratados (Starfrost).

Secar las secciones toda la noche a 56°C.

- Desparafinado:

1. Xilol: 5 min

2. Xilol: 5 min

3. Alcohol 100°: 5 min

4. Alcohol 100°: 5 min

5. Alcohol 96°: 3 min

6. Alcohol 70°: 3 min

Pasar las preparaciones a agua destilada (H₂O_d) durante 10 min.

- Desenmascarado de epítomos:

-Inmersión de las secciones en ácido fórmico (98%) 10 min.

-Lavar 10 min en agua corriente

-Digestión con proteinasa K (PK): 4g/ml, 15 min a 37°C ml de tampón precalentado

-Autoclavado hidratado con tampón citrato Tris EDTA: 10 min a 96°C

- Inmunodetección:

-Cubrir las muestras con solución de peroxidasa (kit Envision-DAB, Dako) durante 5' para bloquear la peroxidasa endógena

-Incubar las muestras con el anticuerpo primario anti-PrP durante 30 min a RT (L42, 1:500 para PrP^{Sc} ovina; 6C2, 1:1000 para PrP^{Sc} en TgVole)

-Lavar con Wash buffer (Tween 20 al 0.1 % en H₂O_d) 5 min x 3 veces

- Incubar con el polímero marcado Envision goat anti-mouse (kit Envision DAB, Dako) durante 30 min y lavar con Wash buffer 5 min x 3 veces
- Incubar con el cromógeno DAB plus (kit Envision DAB, Dako) 5 min
- Lavar con H₂O 5 min x 3 veces
- Contrateñir las muestras con hematoxilina durante 1 min y lavar con H₂O
- Deshidratación y montaje:
 1. Alcohol 70°: inmersión (x 3), Alcohol 96°: inmersión (x 3), Alcohol 100°: inmersión (x3), Alcohol 100°: inmersión (x 3), Xilol: inmersión (x 3), Xilol: inmersión 5 min
 2. Montar en DPX

Anexo 7. Protocolo de RT-qPCR a partir de tejido nervioso

- Extracción de RNA (RNeasy Lipid Tissue Mini kit, Qiagen):

1. Homogeneizar 100 mg de tejido nervioso en 1ml de Qiazol Lysis Reagent (Qiagen) y transferir el homogeneizado a un eppendorf.
2. Añadir 200 µl de cloroformo y agitar fuertemente 15 seg y dejar reposar 2-3 min, luego centrifugar a 12.000g, 15 min, 4°C
3. Dejar que el centrifugado se atempere a RT y trasferir la muestra a estudiar a un tubo.
4. Añadir 1 volumen de etanol al 70% y vortear
5. Transferir hasta 700µl a una columna y centrifugar 15 seg a 8.000g, a 15-25°C
6. Descartar sobrenadante, añadir 700 µl de Buffer RW1 y centrifugar 15 seg a 8.000g
7. Descartar sobrenadante, añadir 500 µl de Buffer RPE y centrifugar 15 seg a 8.000g
8. Descartar sobrenadante, añadir 500 µl de Buffer RPE y centrifugar 2 min a 8.000g
9. Colocar la columna en un tubo colector de 1.5 ml, añadir 50µl de RNase free water y centrifugar 1 min a 8.000 g
10. Eliminar la columna y medir la cantidad de ácido nucleico total con el Nanodrop UV Spectrophotometer Q3000 (Quawell). Conservar las muestras a -80°C

- Retrotranscripción a cDNA: Utilizar el kit de retrotranscripción qScript™ cDNA

SuperMix (Quanta Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la retrotranscripción, diluir el cDNA resultante 1:10 en DNase free water y conservar a -20°C.

- PCR cuantitativa a tiempo real:

1. Utilizar una placa de 96 pocillos y añadir a cada uno:

a. 5 µl de Fast SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems)

b. 0,15 µl del primer forward a la concentración deseada

c. 0,15 µl del primer reverse a la concentración deseada

d. 2,7 µl de agua purificada

e. 2 µl de cDNA

-Antes de meter la placa en la qPCR

Tapar con plástico óptico

Agitar en agitador de placas

Centrifugar

2. Analizar en el termociclador utilizando un paso inicial de 10 min a 95°C, seguido por 40-45 ciclos de 15 seg a 95°C y 30 seg a la temperatura de hibridación de los primers

3. Realizar la curva de disociación (15 seg a 95°C, 1 min a 60°C, 15 seg a 95°C y 15 seg a 60°C).

BIBLIOGRAFÍA

- Acin, C., Bolea, R., Monzon, M., Monleon, E., Moreno, B., Filali, H., Marin, B., Sola, D., Betancor, M., Guijarro, I. M., Garcia, M., Vargas, A. & Badiola, J. J. 2021. Classical and Atypical Scrapie in Sheep and Goats. Review on the Etiology, Genetic Factors, Pathogenesis, Diagnosis, and Control Measures of Both Diseases. *Animals*, 11. doi.10.3390/ani11030691
- Aguzzi, A., Baumann, F. & Bremer, J. 2008. The prion's elusive reason for being. *Annu Rev Neurosci*, 31, 439-77. doi.10.1146/annurev.neuro.31.060407.125620
- Andréoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaïse, C., Simon, S., Le Dur, A., Laude, H., Simmons, H., Lugan, S., Corbière, F., Costes, P., Morel, N., Schelcher, F. & Lacroux, C. 2011. Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, 7, e1001285. doi.10.1371/journal.ppat.1001285
- Atarashi, R., Moore, R. A., Sim, V. L., Hughson, A. G., Dorward, D. W., Onwubiko, H. A., Priola, S. A. & Caughey, B. 2007. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein. *Nat Methods*, 4, 645-50. doi.10.1038/nmeth1066
- Axten, J. M. 2017. Protein kinase R(PKR)–like endoplasmic reticulum kinase (PERK) inhibitors: a patent review (2010-2015). *Expert Opin Ther Pat*, 27, 37-48. doi.10.1080/13543776.2017.1238072
- Bard, J. a. M., Goodall, E. A., Greene, E. R., Jonsson, E., Dong, K. C. & Martin, A. 2018. Structure and Function of the 26S Proteasome. *Annu Rev Biochem*, 87, 697-724. doi.10.1146/annurev-biochem-062917-011931
- 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), 601-7. doi.10.1099/0022-1317-79-3-601
- 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), 509-17. doi.10.1099/0022-1317-76-3-509

- Benestad, S. L., Arsac, J. N., Goldmann, W. & Nöremark, M. 2008. Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res*, 39, 19. doi.10.1051/vetres:2007056
- Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schönheit, 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, 202-8. doi.10.1136/vr.153.7.202
- Betancor, M., Moreno-Martinez, L., Lopez-Perez, O., Otero, A., Hernaiz, A., Barrio, T., Badiola, J. J., Osta, R., Bolea, R. & Martin-Burriel, I. 2021. Therapeutic Assay with the Non-toxic C-Terminal Fragment of Tetanus Toxin (TTC) in Transgenic Murine Models of Prion Disease. *Mol Neurobiol*, 58, 5312-5326. doi.10.1007/s12035-021-02489-5
- Betancor, M., Pérez-Lázaro, S., Otero, A., Marín, B., Martín-Burriel, I., Blennow, K., et al. (2022). Neurogranin and neurofilament light chain as preclinical biomarkers in scrapie. *Int. J. Mol. Sci.* 23:7182. doi: 10.3390/ijms23137182
- Bibo-Verdugo, B., Jiang, Z., Caffrey, C. R. & O'donoghue, A. J. 2017. Targeting proteasomes in infectious organisms to combat disease. *Febs j*, 284, 1503-1517. doi.10.1111/febs.14029
- Bolea, R., Monleón, E., Schiller, I., Raeber, A. J., Acín, C., Monzón, M., Martín-Burriel, I., Struckmeyer, T., Oesch, B. & Badiola, J. J. 2005. Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest*, 17, 467-9. doi.10.1177/104063870501700511
- Bolton, D. C., Mckinley, M. P. & Prusiner, S. B. 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, 218, 1309-11. doi.10.1126/science.6815801
- Bordin, F., Dalvit, C., Caldon, M., Zulian, L., Colamonico, R., Trincanato, S., Mock, B., Reale, S., Mutinelli, F. & Granato, A. 2020. Genetic variability following selection for scrapie resistance in six autochthonous sheep breeds in the province of Bolzano (northern Italy). *J Anim Breed Genet*, 137, 395-406. doi.10.1111/jbg.12478
- Bounhar, Y., Zhang, Y., Goodyer, C. G. & Leblanc, A. 2001. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 276, 39145-9. doi.10.1074/jbc.C100443200

- Brandner, S. & Jaunmuktane, Z. 2017. Prion disease: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*, 133, 197-222. doi.10.1007/s00401-017-1670-5
- Brash, A. G. 1952. Scrapie in imported sheep in New Zealand. *N Z Vet*, 1, 27-30. doi.10.1080/00480169.1952.33096
- Brown, A. R., Rebus, S., Mckimmie, C. S., Robertson, K., Williams, A. & Fazakerley, J. K. 2005. Gene expression profiling of the preclinical scrapie-infected hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun*, 334, 86-95. doi.10.1016/j.bbrc.2005.06.060
- Brown, D. R., Nicholas, R. S. & Canevari, L. 2002. Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. *J Neurosci Res*, 67, 211-24. doi.10.1002/jnr.10118
- Bruce, M. E., Will, R. G., Ironside, J., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., Mccardle, L., Chree, A., Hope, J. & Birkett, C. 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*, 389, 498-501. doi.10.1038/39057
- Bruch, J., Xu, H., Rösler, T. W., De Andrade, A., Kuhn, P. H., Lichtenthaler, S. F., Arzberger, T., Winklhofer, K. F., Müller, U. & Höglinger, G. U. 2017. PERK activation mitigates tau pathology in vitro and in vivo. *EMBO Mol Med*, 9, 371-384. doi.10.15252/emmm.201606664
- Capucchio, M. T., Guarda, F., Pozzato, N., Coppolino, S., Caracappa, S. & Di Marco, V. 2001. Clinical signs and diagnosis of scrapie in Italy: a comparative study in sheep and goats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 48, 23-31. doi.10.1046/j.1439-0442.2001.00312.x
- Carrara, M., Prischi, F., Nowak, P. R., Kopp, M. C. & Ali, M. M. 2015. Noncanonical binding of BiP ATPase domain to Ire1 and Perk is dissociated by unfolded protein CH1 to initiate ER stress signaling. *Elife*, 4. doi.10.7554/eLife.03522
- Carroll, J. A., Striebel, J. F., Rangel, A., Woods, T., Phillips, K., Peterson, K. E., Race, B. & Chesebro, B. 2016. Prion Strain Differences in Accumulation of PrPSc on Neurons and Glia Are Associated with Similar Expression Profiles of Neuroinflammatory Genes: Comparison of Three Prion Strains. *PLoS Pathog*, 12, e1005551. doi.10.1371/journal.ppat.1005551
- 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.

- & Andréoletti, O. 2014. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*, 5, 5821. doi.10.1038/ncomms6821
- Castilla, J., Saá, P. & Soto, C. 2005. Detection of prions in blood. *Nat Med*, 11, 982-5. doi.10.1038/nm1286
- Castle, A. R. & Gill, A. C. 2017. Physiological Functions of the Cellular Prion Protein. *Front Mol Biosci*, 4, 19. doi.10.3389/fmolb.2017.00019
- Chelle, P. 1942. Un cas de tremblante chez la chevre. *Bull Acad Vet Fr*, 15, 294-295.
- Chesebro, B., Race, R., Wehrly, K., Nishio, J., Bloom, M., Lechner, D., Bergstrom, S., Robbins, K., Mayer, L., Keith, J. M. & Et Al. 1985. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*, 315, 331-3. doi.10.1038/315331a0
- Chiarini, L. B., Freitas, A. R., Zanata, S. M., Brentani, R. R., Martins, V. R. & Linden, R. 2002. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. *Embo j*, 21, 3317-26. doi.10.1093/emboj/cdf324
- Chiesa, R. 2015. The Elusive Role of the Prion Protein and the Mechanism of Toxicity in Prion Disease. *PLoS pathogens*, 11, e1004745. doi.10.1371/journal.ppat.1004745
- Ciechanover, A. & Kwon, Y. T. 2017. Protein Quality Control by Molecular Chaperones in Neurodegeneration. *Front Neurosci*, 11, 185. doi.10.3389/fnins.2017.00185
- Collinge, J. 2001. Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, 24, 519-50. doi.10.1146/annurev.neuro.24.1.519
- Condello, C., Degrado, W. F. & Prusiner, S. B. 2020. Prion biology: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Lancet Neurol*, 19, 802-803. doi.10.1016/s1474-4422(20)30274-x
- Cook, R. W., Bingham, J., Besier, A. S., Bayley, C. L., Hawes, M., Shearer, P. L., Yamada, M., Bergfeld, J., Williams, D. T. & Middleton, D. J. 2016. Atypical scrapie in Australia. *Aust Vet J*, 94, 452-455. doi.10.1111/avj.12529
- Costa, R. O., Ferreiro, E., Cardoso, S. M., Oliveira, C. R. & Pereira, C. M. 2010. ER stress-mediated apoptotic pathway induced by Abeta peptide requires the presence of functional mitochondria. *J Alzheimers Dis*, 20, 625-36. doi.10.3233/jad-2010-091369

- Dawson, M., Hoinville, L. J., Hosie, B. D. & Hunter, N. 1998. Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. Scrapie Information Group. *Vet Rec*, 142, 623-5. doi:
- Deslys, J. P., Lasmézas, C. I., Comoy, E. & Domont, D. 2001. Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J*, 161, 1-3. doi.10.1053/tvjl.2000.0530
- Diarra-Mehrpour, M., Arrabal, S., Jalil, A., Pinson, X., Gaudin, C., Piétu, G., Pitaval, A., Ripoche, H., Eloit, M., Dormont, D. & Chouaib, S. 2004. Prion protein prevents human breast carcinoma cell line from tumor necrosis factor alpha-induced cell death. *Cancer Res*, 64, 719-27. doi.10.1158/0008-5472.can-03-1735
- Flynn, G. C., Pohl, J., Flocco, M. T. & Rothman, J. E. 1991. Peptide-binding specificity of the molecular chaperone BiP. *Nature*, 353, 726-30. doi.10.1038/353726a0
- Garza, M. C., Fernandez-Borges, N., Bolea, R., Badiola, J. J., Castilla, J. & Monleon, E. 2011. Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS One*, 6, e27525. doi.10.1371/journal.pone.0027525
- Gavier-Widén, D., Stack, M. J., Baron, T., Balachandran, A. & Simmons, M. 2005. Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest*, 17, 509-27. doi.10.1177/104063870501700601
- Ghemrawi, R. & Khair, M. 2020. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 21. doi.10.3390/ijms21176127
- Goldmann, W., Hunter, N., Foster, J. D., Salbaum, J. M., Beyreuther, K. & Hope, J. 1990. Two alleles of a neural protein gene linked to scrapie in sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 2476-80. doi.10.1073/pnas.87.7.2476
- González, L., Martin, S. & Jeffrey, M. 2003. Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol*, 84, 1339-1350. doi.10.1099/vir.0.18800-0
- Gregori, L., Kovacs, G. G., Alexeeva, I., Budka, H. & Rohwer, R. G. 2008. Excretion of transmissible spongiform encephalopathy infectivity in urine. *Emerg Infect Dis*, 14, 1406-12. doi.10.3201/eid1409.080259

- Griffith, J. S. 1967. Self-replication and scrapie. *Nature*, 215, 1043-4. doi.10.1038/2151043a0
- Halperin, L., Jung, J. & Michalak, M. 2014. The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes. *IUBMB Life*, 66, 318-26. doi.10.1002/iub.1272
- Hamir, A. N., Kunkle, R. A., Bulgin, M. S., Rohwer, R. G., Gregori, L. & Richt, J. A. 2008. Experimental transmission of scrapie agent to susceptible sheep by intralingual or intracerebral inoculation. *Can J Vet Res*, 72, 63-7. doi:
- Hammond, C. & Helenius, A. 1994. Quality control in the secretory pathway: retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol*, 126, 41-52. doi.10.1083/jcb.126.1.41
- Hampton, R. Y. 2002. ER-associated degradation in protein quality control and cellular regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 14, 476-82. doi.10.1016/s0955-0674(02)00358-7
- Harris, D. A. 2003. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull*, 66, 71-85. doi.10.1093/bmb/66.1.71
- Hawkins, S. A., Simmons, H. A., Gough, K. C. & Maddison, B. C. 2015. Persistence of ovine scrapie infectivity in a farm environment following cleaning and decontamination. *Vet Rec*, 176, 99. doi.10.1136/vr.102743
- Haybaeck, J., Heikenwalder, M., Klevenz, B., Schwarz, P., Margalith, I., Bridel, C., Mertz, K., Zirdum, E., Petsch, B., Fuchs, T. J., Stitz, L. & Aguzzi, A. 2011. Aerosols transmit prions to immunocompetent and immunodeficient mice. *PLoS Pathog*, 7, e1001257. doi.10.1371/journal.ppat.1001257
- Healy, A. M., Weavers, E., Mcelroy, M., Gomez-Parada, M., Collins, J. D., O'doherty, E., Sweeney, T. & Doherty, M. L. 2003. The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med*, 17, 908-16. doi.10.1111/j.1939-1676.2003.tb02532.x
- Hetz, C. 2012. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 89-102. doi.10.1038/nrm3270
- Hetz, C., Martinon, F., Rodriguez, D. & Glimcher, L. H. 2011. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev*, 91, 1219-43. doi.10.1152/physrev.00001.2011

- Hetz, C. & Mollereau, B. 2014. Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 15, 233-49. doi.10.1038/nrn3689
- Hetz, C. & Papa, F. R. 2018. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*, 69, 169-181. doi.10.1016/j.molcel.2017.06.017
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Maundrell, K., Castilla, J. & Soto, C. 2003. Caspase-12 and endoplasmic reticulum stress mediate neurotoxicity of pathological prion protein. *Embo j*, 22, 5435-45. doi.10.1093/emboj/cdg537
- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell, K., Castilla, J. & Soto, C. 2005. The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci*, 25, 2793-802. doi.10.1523/JNEUROSCI.4090-04.2005
- Hiramatsu, N., Chiang, W. C., Kurt, T. D., Sigurdson, C. J. & Lin, J. H. 2015. Multiple Mechanisms of Unfolded Protein Response-Induced Cell Death. *Am J Pathol*, 185, 1800-8. doi.10.1016/j.ajpath.2015.03.009
- Hoffstrom, B. G., Kaplan, A., Letso, R., Schmid, R. S., Turmel, G. J., Lo, D. C. & Stockwell, B. R. 2010. Inhibitors of protein disulfide isomerase suppress apoptosis induced by misfolded proteins. *Nat Chem Biol*, 6, 900-6. doi.10.1038/nchembio.467
- Hoinville, L. J. 1996. A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, 15, 827-52. doi.10.20506/rst.15.3.959
- Hoozemans, J. J., Van Haastert, E. S., Nijholt, D. A., Rozemuller, A. J., Eikelenboom, P. & Scheper, W. 2009. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am J Pathol*, 174, 1241-51. doi.10.2353/ajpath.2009.080814
- Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., Van Haastert, E. S., Rozemuller, J. M., Baas, F., Eikelenboom, P. & Scheper, W. 2005. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 110, 165-72. doi.10.1007/s00401-005-1038-0
- Horwich, A. L. & Weissman, J. S. 1997. Deadly conformations—protein misfolding in prion disease. *Cell*, 89, 499-510. doi.10.1016/s0092-8674(00)80232-9

- Houston, F., Mccutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Sisó, S., González, L., Jeffrey, M. & Hunter, N. 2008. Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, 112, 4739-45. doi.10.1182/blood-2008-04-152520
- Hughes, D. & Mallucci, G. R. 2019. The unfolded protein response in neurodegenerative disorders - therapeutic modulation of the PERK pathway. *Febs j*, 286, 342-355. doi.10.1111/febs.14422
- Hunter, N. 1997. PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, 5, 331-4. doi.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, 2897-2905. doi.10.1099/0022-1317-83-11-2897
- Hwang, J. & Qi, L. 2018. Quality Control in the Endoplasmic Reticulum: Crosstalk between ERAD and UPR pathways. *Trends Biochem Sci*, 43, 593-605. doi.10.1016/j.tibs.2018.06.005
- Imran, M. & Mahmood, S. 2011. An overview of human prion diseases. *Virol J*, 8, 559. doi.10.1186/1743-422x-8-559
- Ironside, J. W., Mccardle, L., Hayward, P. A. & Bell, J. E. 1993. Ubiquitin immunocytochemistry in human spongiform encephalopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 19, 134-40. doi.10.1111/j.1365-2990.1993.tb00418.x
- Jin, T., Gu, Y., Zanusso, G., Sy, M., Kumar, A., Cohen, M., Gambetti, P. & Singh, N. 2000. The chaperone protein BiP binds to a mutant prion protein and mediates its degradation by the proteasome. *J Biol Chem*, 275, 38699-704. doi.10.1074/jbc.M005543200
- Kang, S. C., Brown, D. R., Whiteman, M., Li, R., Pan, T., Perry, G., Wisniewski, T., Sy, M. S. & Wong, B. S. 2004. Prion protein is ubiquitinated after developing protease resistance in the brains of scrapie-infected mice. *J Pathol*, 203, 603-8. doi.10.1002/path.1555
- Katz, J. B., Pedersen, J. C., Jenny, A. L. & Taylor, W. D. 1992. Assessment of western immunoblotting for the confirmatory diagnosis of ovine scrapie and bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Vet Diagn Invest*, 4, 447-9. doi.10.1177/104063879200400414

- 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, 40-50. doi.10.1016/j.molbrainres.2004.02.005
- Konold, T., Davis, A., Bone, G., Bracegirdle, J., Everitt, S., Chaplin, M., Saunders, G. C., Cawthraw, S. & Simmons, M. M. 2007. Clinical findings in two cases of atypical scrapie in sheep: a case report. *BMC Vet Res*, 3, 2. doi.10.1186/1746-6148-3-2
- Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J. & Simmons, H. A. 2008. Evidence of scrapie transmission via milk. *BMC Vet Res*, 4, 14. doi.10.1186/1746-6148-4-14
- Kranz, P., Neumann, F., Wolf, A., Classen, F., Pompsch, M., Ocklenburg, T., Baumann, J., Janke, K., Baumann, M., Goepelt, K., Riffkin, H., Metzen, E. & Brockmeier, U. 2017. PDI is an essential redox-sensitive activator of PERK during the unfolded protein response (UPR). *Cell Death Diss*, 8, e2986-e2986. doi.10.1038/cddis.2017.369
- Kristiansen, M., Deriziotis, P., Dimcheff, D. E., Jackson, G. S., Ovaa, H., Naumann, H., Clarke, A. R., Van Leeuwen, F. W., Menendez-Benito, V., Dantuma, N. P., Portis, J. L., Collinge, J. & Tabrizi, S. J. 2007. Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome. *Mol Cell*, 26, 175-88. doi.10.1016/j.molcel.2007.04.001
- Kübler, E., Oesch, B. & Raeber, A. J. 2003. Diagnosis of prion diseases. *Br Med Bull*, 66, 267-79. doi.10.1093/bmb/66.1.267
- Lacroux, C., Cassard, H., Simmons, H., Douet, J. Y., Corbiere, F., Lugan, S., Costes, P., Aron, N., Huor, A., Tillier, C., Schelcher, F. & Andreoletti, O. 2017. Classical scrapie transmission in ARR/ARR genotype sheep. *J. Gen. Virol*, 98, 2200-2204. doi.10.1099/jgv.0.000861
- 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 retropharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res*, 2, 19. doi.10.1186/1746-6148-2-19
- Leal, J. S., Correa, G. L. F., Boos, G. S., Bianchi, M. V., Boabaid, F. M., Lopes, R. F. F. & Driemeier, D. 2015. Scrapie diagnosis in a goat and four Santa Inês sheep from the

- same herd in Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67. doi:<https://doi.org/10.1590/1678-4162-7981>
- Li, L., Jiang, Y., Wang, J. Z., Liu, R. & Wang, X. 2021. Tau Ubiquitination in Alzheimer's Disease. *Front Neurol*, 12, 786353. doi:10.3389/fneur.2021.786353
- Ligios, C., Cancedda, G. M., Margalith, I., Santucci, C., Madau, L., Maestrale, C., Basagni, M., Saba, M. & Heikenwalder, M. 2007. Intraepithelial and interstitial deposition of pathological prion protein in kidneys of scrapie-affected sheep. *PLoS One*, 2, e859. doi:10.1371/journal.pone.0000859
- Lima, F. R., Arantes, C. P., Muras, A. G., Nomizo, R., Brentani, R. R. & Martins, V. R. 2007. Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. *J Neurochem*, 103, 2164-76. doi:10.1111/j.1471-4159.2007.04904.x
- Linden, R., Martins, V. R., Prado, M. A., Cammarota, M., Izquierdo, I. & Brentani, R. R. 2008. Physiology of the prion protein. *Physiol Rev*, 88, 673-728. doi:10.1152/physrev.00007.2007
- Liu, Z., Lv, Y., Zhao, N., Guan, G. & Wang, J. 2015. Protein kinase R-like ER kinase and its role in endoplasmic reticulum stress-decided cell fate. *Cell Death Diss*, 6, e1822. doi:10.1038/cddis.2015.183
- Livneh, I., Cohen-Kaplan, V., Cohen-Rosenzweig, C., Avni, N. & Ciechanover, A. 2016. The life cycle of the 26S proteasome: from birth, through regulation and function, and onto its death. *Cell Res*, 26, 869-85. doi:10.1038/cr.2016.86
- López-Pérez, Ó., Badiola, J. J., Bolea, R., Ferrer, I., Llorens, F. & Martín-Burriel, I. 2020. An Update on Autophagy in Prion Diseases. *Front Bioeng Biotechnol*, 8, 975. doi:10.3389/fbioe.2020.00975
- Lühken, G., Buschmann, A., Groschup, M. H. & Erhardt, G. 2004. Prion protein allele A136 H154Q171 is associated with high susceptibility to scrapie in purebred and crossbred German Merinoland sheep. *Arch Virol*, 149, 1571-80. doi:10.1007/s00705-004-0303-1
- Lyahyai, J., Serrano, C., Ranera, B., Badiola, J. J., Zaragoza, P. & Martín-Burriel, I. 2010. Effect of scrapie on the stability of housekeeping genes. *Anim Biotechnol*, 21, 1-13. doi:10.1080/10495390903323851

- Mabbott, N. A. & Bruce, M. E. 2001. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*, 82, 2307-2318. doi.10.1099/0022-1317-82-10-2307
- Makarava, N., Chang, J., Molesworth, K. & Baskakov, I. 2019. *Loss of region-specific glial homeostatic signature in prion diseases*.
- Mammadova, N., West Greenlee, M. H., Moore, S. J., Hwang, S., Lehmkuhl, A. D., Nicholson, E. M. & Greenlee, J. J. 2020. Evaluation of Antemortem Diagnostic Techniques in Goats Naturally Infected With Scrapie. *Front Vet Sci*, 7, 517862. doi.10.3389/fvets.2020.517862
- Manka, S. W., Zhang, W., Wenborn, A., Betts, J., Joiner, S., Saibil, H. R., Collinge, J. & Wadsworth, J. D. F. 2022. 2.7 Å cryo-EM structure of ex vivo RML prion fibrils. *Nat Commun*, 13, 4004. doi.10.1038/s41467-022-30457-7
- Manni, G., Lewis, V., Senesi, M., Spagnolli, G., Fallarino, F., Collins, S., Mouillet-Richard, S. & Biasini, E. 2020. The cellular prion protein beyond prion diseases. *Swiss Medical Weekly*, 150, w20222.
- Mayer, M., Kies, U., Kammermeier, R. & Buchner, J. 2000. BiP and PDI cooperate in the oxidative folding of antibodies in vitro. *J Biol Chem*, 275, 29421-5. doi.10.1074/jbc.M002655200
- Mays, C. E. & Soto, C. 2016. The stress of prion disease. *Brain Res*, 1648, 553-560. doi.10.1016/j.brainres.2016.04.009
- Mcbride, P. A., Schulz-Schaeffer, W. J., Donaldson, M., Bruce, M., Diringer, H., Kretzschmar, H. A. & Beekes, M. 2001. Early spread of scrapie from the gastrointestinal tract to the central nervous system involves autonomic fibers of the splanchnic and vagus nerves. *J Virol*, 75, 9320-7. doi.10.1128/jvi.75.19.9320-9327.2001
- Mcgowan, J. 1922. Scrapie in sheep. *Scott J Agric*, 5, 365-375. doi:
- Mckinnon, C., Goold, R., Andre, R., Devoy, A., Ortega, Z., Moonga, J., Linehan, J. M., Brandner, S., Lucas, J. J., Collinge, J. & Tabrizi, S. J. 2016. Prion-mediated neurodegeneration is associated with early impairment of the ubiquitin–proteasome system. *Acta Neuropathologica*, 131, 411-425. doi.10.1007/s00401-015-1508-y

- Milisav, I., Šuput, D. & Ribaric, S. 2015. Unfolded Protein Response and Macroautophagy in Alzheimer's, Parkinson's and Prion Diseases. *Molecules*, 20, 22718 - 22756. doi.10.3390/molecules201219865
- Mitchell, G. B., O'rourke, K. I., Harrington, N. P., Soutyrine, A., Simmons, M. M., Dudas, S., Zhuang, D., Laude, H. & Balachandran, A. 2010. Identification of atypical scrapie in Canadian sheep. *J Vet Diagn Invest*, 22, 408-11. doi.10.1177/104063871002200310
- Moreno, J. A., Halliday, M., Molloy, C., Radford, H., Verity, N., Axten, J. M., Ortori, C. A., Willis, A. E., Fischer, P. M., Barrett, D. A. & Mallucci, G. R. 2013. Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice. *Sci Transl Med*, 5. doi.10.1126/scitranslmed.3006767
- Moreno, J. A., Radford, H., Peretti, D., Steinert, J. R., Verity, N., Martin, M. G., Halliday, M., Morgan, J., Dinsdale, D., Ortori, C. A., Barrett, D. A., Tsaytler, P., Bertolotti, A., Willis, A. E., Bushell, M. & Mallucci, G. R. 2012. Sustained translational repression by eIF2 α -P mediates prion neurodegeneration. *Nature*, 485, 507-11. doi.10.1038/nature11058
- Mouillet-Richard, S., Ghazi, A. & Laurent-Puig, P. 2021. The Cellular Prion Protein and the Hallmarks of Cancer. *Cancers*, 13, 5032. doi.10.3390/cancers13195032
- Neutra, M. R., Frey, A. & Kraehenbuhl, J. P. 1996. Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, 86, 345-8. doi.10.1016/s0092-8674(00)80106-3
- Oesch, B., Westaway, D., Wälchli, M., Mckinley, M. P., Kent, S. B. H., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., Prusiner, S. B. & Weissmann, C. 1985. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, 40, 735-746. doi.https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90333-2
- Ohno, M. 2018. PERK as a hub of multiple pathogenic pathways leading to memory deficits and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 141, 72-78. doi.10.1016/j.brainresbull.2017.08.007

- Orsi, A., Fioriti, L., Chiesa, R. & Sitia, R. 2006. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. *J Biol Chem*, 281, 30431-8. doi.10.1074/jbc.M605320200
- Otero, A., Betancor, M., Erana, H., Borges, N. F., Lucas, J. J., Badiola, J. J., Castilla, J. & Bolea, R. 2021. Prion-Associated Neurodegeneration Causes Both Endoplasmic Reticulum Stress and Proteasome Impairment in a Murine Model of Spontaneous Disease. *Int. J. Mol.Sci*, 22. doi.10.3390/ijms22010465
- 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, 10962-6. doi.10.1073/pnas.90.23.10962
- Park, C.-W. & Ryu, K.-Y. 2014. Cellular ubiquitin pool dynamics and homeostasis. *BMB reports*, 47, 475. doi.10.5483/BMBRep.2014.47.9.128
- Park, K. W., Eun Kim, G., Morales, R., Moda, F., Moreno-Gonzalez, I., Concha-Marambio, L., Lee, A. S., Hetz, C. & Soto, C. 2017. The Endoplasmic Reticulum Chaperone GRP78/BiP Modulates Prion Propagation in vitro and in vivo. *Sci Rep*, 7, 44723. doi.10.1038/srep44723
- Perri, E. R., Thomas, C. J., Parakh, S., Spencer, D. M. & Atkin, J. D. 2016. The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Front. Cell. Dev. Biol.* doi.10.3389/fcell.2015.00080
- Prusiner, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, 216, 136-144. doi.10.1126/science.6801762
- Prusiner, S. B. 1991. Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252, 1515-22. doi.10.1126/science.1675487
- Prusiner, S. B. 1998. Prions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 13363-13383. doi.10.1073/pnas.95.23.13363
- Quaglio, E., Restelli, E., Garofoli, A., Dossena, S., De Luigi, A., Tagliavacca, L., Imperiale, D., Migheli, A., Salmona, M., Sitia, R., Forloni, G. & Chiesa, R. 2011. Expression of mutant or cytosolic PrP in transgenic mice and cells is not associated with endoplasmic reticulum stress or proteasome dysfunction. *PLoS One*, 6, e19339. doi.10.1371/journal.pone.0019339

- Radford, H., Moreno, J. A., Verity, N., Halliday, M. & Mallucci, G. R. 2015. PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol*, 130, 633-642. doi.10.1007/s00401-015-1487-z
- Roller, C. & Maddalo, D. 2013. The Molecular Chaperone GRP78/BiP in the Development of Chemoresistance: Mechanism and Possible Treatment. *Front Pharmacol*, 4, 10. doi.10.3389/fphar.2013.00010
- Rubenstein, R., Bulgin, M. S., Chang, B., Sorensen-Melson, S., Petersen, R. B. & Lafauci, G. 2012. PrPSc detection and infectivity in semen from scrapie-infected sheep. *J.Gen. Virol*, 93, 1375-1383. doi.10.1099/vir.0.038802-0
- Ryder, S., Spencer, Y., Bellerby, P. & March, S. 2001. Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet. Rec*, 148, 7-13. doi.10.1136/vr.148.1.7
- Safar, J. G., Lessard, P., Tamgüney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., Dearmond, S. J. & Prusiner, S. B. 2008. Transmission and detection of prions in feces. *The J. Infect. Dis*, 198, 81-89. doi.10.1086/588193
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleón, E., Badiola, J. J., Zaragoza, P. & Martín-Burriel, I. 2009. Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Vet Res*, 40, 42. doi.10.1051/vetres/2009024
- Shacham, T., Patel, C. & Lederkremer, G. Z. 2021. PERK Pathway and Neurodegenerative Disease: To Inhibit or to Activate? *Biomolecules*, 11. doi.10.3390/biom11030354
- Simmons, M. M., Konold, T., Thurston, L., Bellworthy, S. J., Chaplin, M. J. & Moore, S. J. 2010. The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC veterinary research*, 6, 1-10. doi.10.1186/1746-6148-6-14
- 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, 747892. doi.10.1155/2010/747892

- Soto, C., Saborio, G. P. & Anderes, L. 2002. Cyclic amplification of protein misfolding: application to prion-related disorders and beyond. *Trends in Neurosciences*, 25, 390-394. doi:[https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02195-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02195-1)
- Steele, A. D., Lindquist, S. & Aguzzi, A. 2007. The prion protein knockout mouse: a phenotype under challenge. *Prion*, 1, 83-93. doi:[10.4161/pri.1.2.4346](https://doi.org/10.4161/pri.1.2.4346)
- Stutzbach, L. D., Xie, S. X., Naj, A. C., Albin, R., Gilman, S., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Devlin, B. & Schellenberg, G. D. 2013. The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 1, 31. doi:[10.1186/2051-5960-1-31](https://doi.org/10.1186/2051-5960-1-31)
- Tanaka, K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85, 12-36. doi:[10.2183/pjab.85.12](https://doi.org/10.2183/pjab.85.12)
- Tanaka, M., Yamasaki, T., Hasebe, R., Suzuki, A. & Horiuchi, M. 2020. Enhanced phosphorylation of PERK in primary cultured neurons as an autonomous neuronal response to prion infection. *Plos One*, 15. doi:[10.1371/journal.pone.0234147](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234147)
- Teferedeg, E. Y., Yaman, Y. & Un, C. 2020. Five novel PRNP gene polymorphisms and their potential effect on Scrapie susceptibility in three native Ethiopian sheep breeds. *Bmc Veterinary Research*, 16. doi:[10.1186/s12917-020-02336-0](https://doi.org/10.1186/s12917-020-02336-0)
- 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, 1-7. doi:[10.1186/1297-9716-42-65](https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-65)
- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F. & Ferraro, A. 2002. Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, 193, 154-63. doi:[10.1002/jcp.10172](https://doi.org/10.1002/jcp.10172)
- Unterberger, U., Höftberger, R., Gelpi, E., Flicker, H., Budka, H. & Voigtländer, T. 2006. Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 348-57. doi:[10.1097/01.jnen.0000218445.30535.6f](https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000218445.30535.6f)
- Unterberger, U., Voigtländer, T. & Budka, H. 2005. Pathogenesis of prion diseases. *Acta Neuropathol*, 109, 32-48. doi:[10.1007/s00401-004-0953-9](https://doi.org/10.1007/s00401-004-0953-9)

- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B. C., Remm, M. & Rozen, S. G. 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40, e115-e115. doi.10.1093/nar/gks596
- Van Keulen, L. J. M., Vromans, M. E. W. & Van Zijderveld, F. G. 2002. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apmis*, 110, 23-32. doi.10.1034/j.1600-0463.2002.100104.x
- Vascellari, M., Aufiero, G. M., Nonno, R., Agrimi, U., Vaccari, G., Basilicata, L., Falcaro, C., Mancin, M., Marcon, S. & Mutinelli, F. 2005. Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. *Arch Virol*, 150, 1959-76. doi.10.1007/s00705-005-0564-3
- 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, 4872-6. doi.10.1128/jvi.02148-06
- Wang, C. C. 1998. Isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are both required for its function as a foldase. *Biochemistry (Mosc)*, 63, 407-12. doi:
- Wang, S. B., Shi, Q., Xu, Y., Xie, W. L., Zhang, J., Tian, C., Guo, Y., Wang, K., Zhang, B. Y., Chen, C., Gao, C. & Dong, X. P. 2012. Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. *PLoS One*, 7, e38221. doi.10.1371/journal.pone.0038221
- Weissmann, C. & Flechsig, E. 2003. PrP knock-out and PrP transgenic mice in prion research. *Br. Med. Bull*, 66, 43-60. doi.10.1093/bmb/66.1.43
- 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, 419-20. doi.10.1136/vr.121.18.419
- Wemheuer, W. M., Benestad, S. L., Wrede, A., Wemheuer, W. E., Brenig, B., Bratberg, B. & Schulz-Schaeffer, W. J. 2011. PrPSc spreading patterns in the brain of sheep linked to different prion types. *Vet Res*, 42, 32. doi.10.1186/1297-9716-42-32

- Wilesmith, J. W., Wells, G., Cranwell, M. P. & Ryan, J. 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *The Veterinary Record*, 123, 638-644.
- Wilham, J. M., Orrú, C. D., Bessen, R. A., Atarashi, R., Sano, K., Race, B., Meade-White, K. D., Taubner, L. M., Timmes, A. & Caughey, B. 2010. Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays. *PLoS pathogens*, 6, e1001217. doi.10.1371/journal.ppat.1001217
- 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, 167-74. doi.10.1136/vr.140.7.167
- Xiang, C., Wang, Y., Zhang, H. & Han, F. 2017. The role of endoplasmic reticulum stress in neurodegenerative disease. *Apoptosis*, 22, 1-26. doi.10.1007/s10495-016-1296-4
- Xu, K. & Zhu, X. P. 2012. Endoplasmic reticulum stress and prion diseases. *Rev Neurosci*, 23, 79-84. doi.10.1515/rns.2011.062
- Yedidia, Y., Horonchik, L., Tzaban, S., Yanai, A. & Taraboulos, A. 2001. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. *Embo J*, 20, 5383-91. doi.10.1093/emboj/20.19.5383
- Yoo, B. C., Krapfenbauer, K., Cairns, N., Belay, G., Bajo, M. & Lubec, G. 2002. Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*, 334, 196-200. doi.https://doi.org/10.1016/S0304-3940(02)01071-6
- Zheng, Q., Huang, T., Zhang, L., Zhou, Y., Luo, H., Xu, H. & Wang, X. 2016. Dysregulation of Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci*, 8. doi.10.3389/fnagi.2016.00303