



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Máster en Salud Global

Detección inmunohistoquímica de biomarcadores de enfermedades neurodegenerativas

**Immunohistochemical detection of neurodegenerative disease
biomarkers**

Autor

Víctor Llorens Abadía

Directores

Alicia Otero García

Diego Sola Fraca

Facultad de Veterinaria

2023/2024

ÍNDICE

RESUMEN	0
ABSTRACT.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES.....	2
1.1.1. <i>Etiología de las EET</i>	2
1.1.2. <i>Agente causal de las EET</i>	4
1.2. SCRAPIE	6
1.2.1. <i>Transmisión y patogenia</i>	6
1.2.2. <i>Factores genéticos</i>	8
1.2.3. <i>Diagnóstico</i>	9
1.2.4. <i>Sistemas de control y prevención</i>	11
1.3. BIOMARCADORES EN ENFERMEDADES PRIÓNICAS	12
1.3.1. <i>YKL-40</i>	14
1.3.2. <i>Antiquimotripsina (α1- ACT)</i>	14
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	15
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	16
3.2. ANIMALES SELECCIONADOS PARA EL ESTUDIO	16
3.3. MUESTRAS.....	16
3.4. SELECCIÓN DE ANTICUERPOS Y PUESTA A PUNTO	17
3.5. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA YKL-40 Y ACT.....	17
3.6. INMUNOHISTOQUÍMICA PARA PRP ^{Sc}	19
3.7. TINCIÓN HEMATOXILINA-EOSINA	19
3.8. VALORACIÓN MICROSCÓPICA.....	20
3.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
3.10. TOMA DE FOTOGRAFÍAS.....	21
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
4.3. DEPÓSITO Y ACUMULACIÓN DE YKL-40 EN LAS DISTINTAS ÁREAS DEL ENCÉFALO	21
4.4. DEPÓSITO Y ACUMULACIÓN DE 1-ANTIQUIMOTRIPSINA EN LAS DISTINTAS ÁREAS DEL ENCÉFALO.....	25
4.1. DEPÓSITO Y ACUMULACIÓN DE PRP ^{Sc} EN LAS DISTINTAS ÁREAS DEL ENCÉFALO	29
4.2. VACUOLIZACIÓN PRESENTE EN LAS DISTINTAS ÁREAS DEL ENCÉFALO	31
4.5. FUTURAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN EN UN MARCO ONE HEALTH	33
5. CONCLUSIONES	34
6. BIBLIOGRAFÍA	35

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer especialmente a mis tutores Alicia Otero García y Diego Sola Fraca por todo lo que me han ayudado en este trabajo y todo lo que he aprendido gracias a ellos. Gracias también por haber sido los mejores tutores que podría haber tenido.

Muchísimas gracias también a Nerea Larrañaga Martínez por haberme acompañado durante todo este tiempo y haber sido una ayuda fundamental para hacer este trabajo. Espero de corazón que tu tesis vaya estupendamente y que crees tan buenos recuerdos en el laboratorio como yo los he hecho contigo.

Dar las gracias también a Paula Ariadna Marco Lorente por haberme hecho disfrutar el tiempo que hemos estado juntos dentro y fuera del laboratorio. Asimismo, quiero agradecer a todo el personal del Centro de Encefalopatías por toda la ayuda y amabilidad que han tenido conmigo.

Por último, agradecer a mi familia y amigos por todo su apoyo y paciencia que han tenido conmigo y por confiar siempre en mí.

RESUMEN

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles son un grupo de patologías neurodegenerativas que afectan tanto a los animales como al ser humano. Entre ellas, se encuentra el scrapie. Dicha enfermedad afecta tanto a cabras como a ovejas y comprende la forma clásica y la forma atípica. El scrapie es una de las encefalopatías espongiformes transmisibles más importantes y se utiliza como modelo de otras enfermedades neurodegenerativas producidas por proteínas como son el Alzheimer y el Párkinson. Las enfermedades priónicas normalmente se diagnostican en el estadio sintomático, cuando el daño neuronal ya es extenso e irreversible. Por ello, es necesaria la búsqueda de biomarcadores que permitan la detección de casos preclínicos. En el caso del scrapie, el análisis de biopsias rectales permite la detección de algunos animales preclínicos, lo cual lo hace un buen modelo de estudio. Por esto se decidió analizar la acumulación de dos marcadores que se ha sugerido que podrían actuar como biomarcadores para las enfermedades neurodegenerativas humanas (YKL-40 y α 1-antiquimotripsina) en encéfalos de ovejas infectadas por scrapie mediante la técnica inmunohistoquímica.

ABSTRACT

Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies are a group of neurodegenerative pathologies that affect both animals and humans. Among them is scrapie. This disease affects both goats and sheep and includes the classical form and the atypical form. Scrapie is one of the most important transmissible spongiform encephalopathies and is used as a model for other protein-mediated neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Prion diseases are usually diagnosed at the symptomatic stage, when neuronal damage is already extensive and irreversible. Therefore, it is necessary to search for biomarkers that allow the detection of preclinical cases. In the case of scrapie, the analysis of rectal biopsies allows the detection of some preclinical animals, which makes it a good study model. For this reason, it was decided to analyze the accumulation of two markers that have been suggested to act as biomarkers for human

neurodegenerative diseases (YKL-40 and Antichymotrypsin alpha-1) in the brains of scrapie-infected sheep by immunohistochemistry.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas constituyen un grupo de patologías neurodegenerativas crónicas con un largo periodo de incubación y cuyo desenlace es fatal al no haber sido descubierto aún ningún tipo de tratamiento eficaz. Se caracterizan por el deterioro progresivo de tipo espongiforme del sistema nervioso central [1].

1.1.1. Etiología de las EET

Hasta la fecha se conocen en torno a una veintena de EET con diferentes orígenes, hospedadores y etiología: se pueden dividir en genéticas, esporádicas e infecciosas. Estas últimas son el resultado de la entrada del agente causal en el organismo por diferentes vías, como puede ser la ingesta de comida contaminada con la proteína prion, por transmisión vertical durante la lactancia o el parto y por vía iatrogénica durante el trasplante de médula o tras alguna operación quirúrgica donde se ha empleado material que no ha sido esterilizado de manera adecuada, entre otras [2, 3].

Por lo que respecta a las EET humanas (Tabla 1), la gran parte son esporádicas ya que el 85% de todos los casos detectados en humanos corresponden a la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe), afectando principalmente a personas mayores de 55 años independientemente del sexo. Las EET hereditarias aparecen ligadas a mutaciones del gen que codifica la proteína prion, denominado *PRNP*. Dicho cambio se produce en la segunda mitad del gen debido a que es la sección donde los motivos estructurales condicionan el cambio conformacional de proteína normal a patológica. Representan en torno al 15% de los casos de EET en humanos y comprenden el insomnio familiar fatal (IFF), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) y la enfermedad de Creutzfeldt-

Jakob familiar (ECJf). Por último, los humanos también pueden estar expuestos a priones por distintas vías de exposición y de este modo contraer alguna EET infecciosa. Las distintas vías más observadas son la iatrogénica mediante transfusiones u hormonas (enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica o ECJi), ingesta de alimentos contaminados con el prion (variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o vECJ) y también por canibalismo al comerse el cerebro de los difuntos como practicaban los nativos de la tribu fore situados en Papúa-Nueva Guinea (Kuru) [2,3,4].

En cuanto a las EET animales, tanto las genéticas como las esporádicas son mucho menos frecuentes que en humanos, mencionando solo la encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) atípica o el scrapie atípico [5,6]. Por ello, las formas infecciosas son las más comunes dentro de las EET animales transmitiéndose principalmente por vía horizontal mediante la ingesta de alimentos o pastos contaminados con priones debido al contacto directo con animales infectados. También se han encontrado evidencias de transmisión por vía horizontal durante la gestación o la lactancia. La vía más común es la oral, se produce al ingerir alimento contaminado, esto ha dado lugar a la conocida epidemia que tuvo lugar en Reino Unido a finales de los años 80 y que fue provocada por alimentar a rumiantes con piensos comerciales contaminados fabricados con harinas de carne y hueso animal. Esto provocó la prohibición en 1988 de alimentar a rumiantes con harinas de carne y hueso [2, 7, 8].

Tabla 1. Etiología de las EET humanas [3, 4, 6, 9]

EET Humanas

Enfermedad	Hospedador	Etiología	Año
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica (ECJi)	Humano	Infecciosa	1974
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe)	Humano	Esporádica	1920
Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (ECJf)	Humano	Genética	1924
Insomnio esporádico fatal (IEF)	Humano	Esporádica	1999
Insomnio familiar fatal (IFF)	Humano	Genética	1986
Kuru	Humano	Infecciosa	1957
Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS)	Humano	Genética	1936

Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ) Humano Infecciosa 2008

Tabla 2. Etiología de las EET animales [3, 4, 6, 9]

EET Animales			
Enfermedad	Hospedador	Etiología	Año
Scrapie clásico	Ovino y caprino	Infecciosa	1732
Scrapie atípico	Ovino y caprino	Esporádica	1998
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) clásica	Bovino	Infecciosa	1986
Encefalopatía espongiforme bovina (EEB) atípica H y L	Bovino	Esporádica o genética	2003
Enfermedad crónica caquetizante (ECC)	Cérvidos	Infecciosa	1967
Encefalopatía espongiforme felina	Felinos	Infecciosa	1990
Encefalopatía transmisible del visón (ETV)	Visón	Infecciosa	1947
Encefalopatía de ungulados exóticos (EUE)	Órice, myala, gran kudú	Infecciosa	1986
EET en primates	Lemur y macaco	Infecciosa	1996
Encefalopatía priónica del camello (CPD)	Dromedario	Sin determinar	2018

1.1.2. Agente causal de las EET

Independientemente de su origen, las EET están producidas por un agente causal cuyas características indican que carece de material genético debido a la ausencia de ácidos nucleicos. Esto dio pie a que surgieran diferentes hipótesis tales como que el agente causal era un polisacárido replicante, un fragmento de membrana o incluso que estaba formado por un ácido nucleico y proteína. Finalmente, la hipótesis más aceptada fue la propuesta por Prusiner en 1982 afirmando que «sólo es una proteína». Además, definió estos agentes causales como “pequeñas partículas proteicas infecciosas” y las denominó priones [2, 9].

Los priones están formados por lo que se conoce como proteína priónica celular o PrP^c, una glicoproteína de membrana que es codificada por el gen *PRNP* (prion protein gene) y que, a pesar de ser encontrado en la gran mayoría de órganos de forma constitutiva, abunda principalmente en el sistema nervioso central (SNC). Hasta la fecha, la función de la PrP^c no es del todo conocida, no obstante, existen estudios donde se indica que podría estar implicada en el mantenimiento de la función sináptica mediante la regulación

de la transmisión sináptica; conservación de la vaina de mielina neuronal; homeostasis y continuidad del sueño; protección contra el estrés oxidativo entre otras muchas funciones [10-12].

El cambio conformacional que tiene lugar debido a un mal plegamiento de la PrP^c provoca que la estructura secundaria de la proteína pase de ser rica en hélices alfa (40% de hélices α y 3% de hoja plegada β) a una estructura rica en hojas plegadas beta (casi en su totalidad). Esta transformación provoca que la PrP^c de lugar a una isoforma anormal y patogénica denominada "proteína priónica patológica", "prion" o PrP^{Sc} correspondiendo Sc a la palabra scrapie. Estudios comparativos de ambas proteínas demuestran que dicho cambio conformacional es postraduccional, provocando que difieran tanto en las propiedades físicas como en las químicas de la PrP^c respecto a las que posee la PrP^{Sc}. Mientras que la primera es soluble en detergentes no desnaturalizantes y además puede ser completamente digerida por proteasas, la isoforma patológica PrP^{Sc} es resistente a los detergentes, tratamientos con formaldehído, a la radiación ultravioleta e ionizante y únicamente es parcialmente digerida por proteasas, dando lugar a la isoforma conocida como PrP^{Sc} 27-30 cuyo nombre es debido a ser un derivado de la PrP^{Sc} y tener un tamaño de entre 27-30 kDa procedente del extremo C-terminal. Además, la PrP^{Sc} tiene la capacidad de replicarse a sí misma induciendo la conversión de PrP^c en PrP^{Sc}, lo cual sumado a su alta resistencia a la degradación facilitará la formación y acumulación de agregados y de depósitos de la isoforma patológica con una alta toxicidad [15-18].

Por lo tanto, mientras se produce la propagación por parte de los priones en el cerebro y van induciendo la conversión de PrP^c a PrP^{Sc}, también se van formando depósitos en los distintos órganos, aunque principalmente en el SNC. Tendrá lugar la incubación y desarrollo de la patología, dando lugar a la aparición de patrones lesionales como la vacuolización del pericarion neuronal y del neuropilo de la sustancia gris, degeneración neuronal, gliosis y astrocitosis. Algunos de estos síntomas no podrán ser observados o detectados hasta la fase final de la enfermedad pues se trata de una patología que tiene periodos de incubación muy largos (meses o incluso años) propios de las EET.

1.2. Scrapie

El scrapie es una patología priónica que también se conoce con el nombre de “tembladera” o “prurito lumbar” y ha servido como prototipo de las EET puesto que es la que se conoce desde hace más tiempo. Se trata de una enfermedad endémica en muchos países que afecta a ovejas y cabras. Como el resto de enfermedades priónicas tiene un carácter lento y progresivo y se caracteriza por la aparición de signos neurológicos a medida que se degenera el sistema nervioso central. Actualmente se conocen dos tipos de scrapie: la forma clásica y la forma atípica [4, 9, 14].

El scrapie clásico, afecta a ovejas y cabras adultas (2-5 años) debido a su largo periodo de incubación y necesidad de acumularse para que se produzca la enfermedad. Es independiente del sexo, así como de la raza y aptitud. Tiene un inicio insidioso con un desenlace fatal puesto que una vez detectados los signos clínicos suele producirse la muerte del animal entre 1-6 meses [13]. Desde el primer caso de scrapie reportado en 1732 en Reino Unido se ha distribuido por gran parte del mundo, estando presente en Europa, América, África y Asia. Únicamente ha sido erradicado en Australia y Nueva Zelanda, por lo que se trata de una enfermedad endémica en numerosos países todavía.

Por otra parte, la forma atípica, que se considera esporádica, afecta generalmente a cabras y ovejas mayores de 5 años. La cepa priónica de esta forma se denomina Nor98 al haber sido descubierta en el año 1998 en Noruega a pesar de existir estudios que demuestran su existencia desde, al menos, 1972. Por lo que respecta a la distribución geográfica del scrapie atípico, difiere de la forma clásica en que se encuentra presente hasta en países considerados libres de scrapie clásico, siendo actualmente la enfermedad priónica animal más extendida en el mundo [19, 20].

1.2.1. Transmisión y patogenia

En cuanto a la transmisión y patogenia existen diferencias entre la forma clásica y la atípica. Esta segunda se caracteriza por ser considerada esporádica, es decir, aparece de forma espontánea en casos aislados [21-

24], mientras que el scrapie clásico es una forma infecciosa tras demostrarse que se puede transmitir tanto de forma vertical como horizontal.

Actualmente sigue habiendo ciertas dudas sobre las rutas por las que se produce la infección en el scrapie clásico. Al tener un periodo tan largo de incubación, se dificulta la relación entre los casos clínicos y las fuentes originales de infección. Los estudios epidemiológicos sugieren la vía horizontal como principal vía de transmisión, pudiendo ser por contacto directo entre animales o, indirectamente, a través de la contaminación en el ambiente al haber sido liberado los priones mediante excreciones como heces u orina, secreciones como saliva o leche además de esperma y carcasas de animales infectados [3, 25-27]. Una de las principales fuentes de contaminación ambiental del scrapie clásico son las placentas, ya que se trata de un órgano donde se produce una gran acumulación de priones. En el momento que la placenta entra en contacto con el medio también se produce una contaminación de éste y su posterior manejo y desinfección se verá dificultado debido a la alta resistencia de los priones frente a la degradación, así como a los diferentes tratamientos de descontaminación. [29]. Por otro lado, los animales tienen un instinto de comer la placenta, de modo que la infección se seguirá propagando. Además, también hay casos descritos de transmisión iatrogénica debido al uso de inyecciones, transfusiones o uso de vacunas como ocurrió en 1946 con la vacuna de Looping ill o en 1998 con la vacuna de Mycoplasma [25].

Experimentalmente se ha demostrado que el scrapie puede transmitirse por vía oral, intraperitoneal, intravenosa, intracerebral, intraocular y conjuntival [3, 25, 30-33]. No obstante, en condiciones naturales, la principal vía de entrada al organismo es la vía oral, penetrando el prion en el organismo mediante su paso a través del tracto intestinal. Otra vía de entrada también podría ser a través de la tonsila palatina, siendo éste el primer punto de multiplicación de la PrP^{Sc}. Tras la ingesta del material contaminado con priones (especialmente placentas de animales infectados), éstos llegarán al tracto digestivo y atravesarán el epitelio intestinal gracias a la acción de enzimas digestivas (fragmentan la PrP^{Sc} favoreciendo su asociación con proteínas que facilitan su transporte), células dendríticas (tienen como función captar antígenos que se encuentren en el lumen intestinal), y las

células M, que son unas células epiteliales especializadas situadas en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) de las placas de Peyer ileales y que juegan un papel fundamental en la captación y transporte de antígenos desde el lumen intestinal hasta el tejido linfoide subepitelial, donde son presentados a macrófagos y células dendríticas foliculares del sistema linforreticular (SLR). Esto dará lugar a la respuesta inmune además de la replicación y acumulación de PrP^{Sc} en dichas células durante un tiempo variable. A partir de este punto comienza la neuroinvasión, de modo que se produce una transferencia de los priones al sistema nervioso entérico, desde donde se dirigirán al SNC a través del sistema nervioso periférico o mediante vía hematogena [33]. Una vez los priones han alcanzado el SNC, la PrP^{Sc} se disemina por el encéfalo y la médula espinal, así como otros órganos y tejidos periféricos. Se comienza a acumular la PrP^{Sc} desencadenando una respuesta neurotóxica caracterizada por signos clínicos como la neuroinflamación, alteraciones sinápticas, muerte neuronal, vacuolización del neuropilo o degeneración neuronal esponjiforme.

A diferencia de la forma clásica, en lo que respecta a la transmisión y patogenia del scrapie atípico, éste no ha sido tan evidenciado. La hipótesis que más se sigue es que la acumulación y distribución de la PrP^{Sc} está limitado al SNC, lo que respalda su etiología esporádica [19]. Sin embargo, se ha demostrado la posible infectividad en el tejido linfoide, nervios y músculos de individuos con scrapie atípico natural o experimental incluso si la PrP^{Sc} no se ha detectado. Esto, sumado a la posibilidad de transmitir experimentalmente por vía oral esta patología ha provocado que se replantee la etiología de la enfermedad [34].

1.2.2. Factores genéticos

En ambas variantes del scrapie, clásico y atípico, se ha identificado una influencia significativa del gen *PRNP* en la resistencia y susceptibilidad de cabras y ovejas a esta patología. Se han descrito varios polimorfismos que pueden facilitar o dificultar la conversión de PrP^C a PrP^{Sc} al modificar ciertos aminoácidos o dominios críticos de la proteína, lo que afectaría al desarrollo de la enfermedad [35,36].

El gen *PRNP* ovino se encuentra localizado en el cromosoma 13, para el cual se han descrito un gran número de polimorfismos, aunque la mayoría son poco frecuentes o no se encuentran asociados a ningún fenotipo. Se ha observado que existe una clara influencia del genotipo en cuando a la susceptibilidad o resistencia genética frente al scrapie clásico. Los codones clave son el 136,154 y 171 y en concreto los polimorfismos A136V (alanina → valina), R154H (arginina → histidina) y Q171R o Q171H (glutamina → arginina o histidina). Existen doce posibles alelos (ARQ, ARR, ARH, AHQ, AHR, AHH, VRQ, VRR, VRH, VHQ, VHR, VHH), no obstante, hay cinco de ellos que aparecen con mayor frecuencia (ARR, ARQ, ARH, AHQ, VRQ). De estos cinco alelos el ARR y AHQ están asociados con una mayor resistencia a la patología mientras que el alelo VRQ presenta una mayor susceptibilidad al scrapie clásico. Teniendo en cuenta todas las combinaciones haplotípicas de los genotipos resultantes se puede hacer una clasificación con cinco categorías en función del nivel de susceptibilidad o resistencia al scrapie clásico; el genotipo ARR/ARR se encuentra asociado con una mayor resistencia al scrapie clásico, mientras que el VRQ/VRQ está asociado con una mayor susceptibilidad [9, 14, 37]. No obstante, esta clasificación no es válida para el scrapie atípico y su susceptibilidad ya que además de estar asociado con los polimorfismos de los codones 136 y 154 también tiene relación con el polimorfismo L141F (leucina → fenilalanina). La característica del scrapie atípico en cuanto a su genotipado es que se ha descrito su presencia en ovejas con genotipo resistente al scrapie clásico, de modo que los genotipos AHQ, AHQ/ARQ y ARR, junto con homocigosidad para fenilalanina en codón 141, son aquellos que presentan una mayor susceptibilidad; mientras que aquellos que tengan el alelo VRQ serán más resistentes y rara vez padecerán la enfermedad [38, 39].

1.2.3. Diagnóstico

Para llevar a cabo el diagnóstico de scrapie se suele emplear una combinación de métodos de diagnóstico clínico con una posterior confirmación laboratorial, puesto que sería insuficiente para un diagnóstico definitivo basarse solo en la clínica, ya que los signos clínicos de esta patología son muy inespecíficos y puede ser confundidos con otras enfermedades (como listeriosis cerebral,

dermatitis o ectoparasitismo). Los signos clínicos del scrapie clásico se suelen observar en animales de entre 2 a 5 años, teniendo un comienzo de manera insidiosa al empezar con cambios en el estado mental, actividad y comportamiento que conllevarán a otros signos neurológicos más notorios como pueden ser el prurito (característico de esta patología), temblores musculares, ataxia y descoordinación de la marcha. Por otro lado, los signos del scrapie atípico normalmente se manifiestan en animales mayores de 5 años, siendo la ataxia el principal signo observable en ausencia de prurito, además se pueden percibir otros signos como cambios en el comportamiento, postura y pérdida de la condición corporal [40-42].

En cuanto al diagnóstico laboratorial, aquellos métodos reconocidos oficialmente se realizan en muestras procedentes de tejido del SNC *post mortem*. Dado que en el caso del scrapie clásico también se produce una distribución de la PrP^{Sc} por el sistema linfoide, es posible realizar un diagnóstico *in vivo* a partir de muestras de tejido linfoide obtenidos de biopsias del tercer párpado, tonsilas palatinas y mucosa rectal [43-44]. Sin embargo, esto último no sería viable para el scrapie atípico ya que la acumulación del PrP^{Sc} se produce únicamente en el SNC [19].

Generalmente, la gran mayoría de las técnicas de diagnóstico que se emplean hoy en día se basan en la detección de PrP^{Sc} en muestras de tejido (especialmente del SNC). De las técnicas de diagnóstico utilizadas es necesario apuntar dos gold standard como son el *Western Blot* y la inmunohistoquímica (IHQ); ambas técnicas se basan en detectar el fragmento resistente a la proteinasa K (PrP^{res}) de la PrP^{Sc} utilizando anticuerpos específicos [45]. Además, cada una de estas dos técnicas tiene distintas utilidades.

Por un lado, el Western Blot permite además de la detección de la PrP^{Sc}, la caracterización de las cepas priónicas implicadas y de este modo poder diferenciar entre el scrapie clásico del atípico en función del patrón electroforético de la PrP^{Sc}, que varían por sus diferentes grados de glicosilación [22,46]. Por otra parte, la IHQ también es bastante útil, diferenciando entre el scrapie clásico y atípico puesto que permite la detección *in situ* de depósitos de PrP^{Sc} así como su localización celular,

distribución tisular y características morfológicas pues varían en función de la cepa priónica y el genotipo del portador [9, 45]; mientras que para el scrapie clásico la inmunotinción observable es normalmente bilateral y principalmente localizable en tronco encefálico con diferentes patrones morfológicos de depósito, para el scrapie atípico la inmunotinción ocurre principalmente en las cortezas cerebelosa y cerebral con una menor diversidad de patrones morfológicos de depósito [21]. Además, la IHQ permite la detección de PrP^{Sc} en muestras de tejido linfóide obtenidas del tercer párpado, tonsilas palatinas y mucosa rectal [43, 44].

Otros métodos de diagnóstico distintos a estas técnicas que también se basan en la inmunodetección de PrP^{Sc}, son los conocidos "test rápidos". Dentro de estas técnicas encontramos la ELISA o "enzyme-linked immunosorbent assay", la observación de fibrillas asociadas al scrapie, bioensayo en roedores o las técnicas ultrasensitivas (como Protein Misfolding Cyclic Amplification y Real-Time Quaking-Induced Conversion). Estas últimas permiten amplificar bajas concentraciones de PrP^{Sc} no detectables por técnicas convencionales de diagnóstico y, para la detección del scrapie, sólo se utilizan a nivel experimental [43, 44, 47].

1.2.4. Sistemas de control y prevención

Dado que todavía no existe ningún tipo de tratamiento o vacuna que haga frente al scrapie, las medidas de control y prevención para esta patología se basan principalmente en los programas de vigilancia activa y pasiva. Por un lado, la vigilancia activa está destinada a buscar activamente la enfermedad, realizando un muestreo aleatorio a un número determinado de animales que se agrupan en "subpoblaciones" y que han de ser representativos. Se centran en el análisis *post mortem* mediante pruebas de diagnóstico rápido de muestras procedentes del SNC obtenidos de animales mayores de 18 meses que han sido sacrificados para consumo humano, encontrados muertos o sacrificados fuera de un contexto de epidemia. En caso de que los resultados obtenidos de las pruebas rápidas sean positivo o dudoso, se tendrán que confirmar mediante un análisis histopatológico, IHQ, *Western Blot* u observación de las fibrillas características por microscopía electrónica. Cuando se obtenga un positivo de alguna de estas pruebas, el animal será

considerado como positivo en scrapie y será necesaria la realización de pruebas de discriminación entre scrapie clásico o atípico, así como un genotipado del gen *PRNP*.

Por otro lado, la vigilancia pasiva consiste en la detección de animales positivos por parte de los ganaderos y veterinarios responsables de los animales basándose en la sintomatología clínica compatible con el scrapie. Por lo tanto, se someterán a un análisis histopatológico, así como IHQ y Western Blot en animales vivos, sacrificados o muertos que hayan presentado o presenten anomalías neurológicas, de comportamiento o trastorno del SNC. En el caso de obtener algún positivo o no concluyente se seguirán los mismos pasos que se toman en la vigilancia activa ya mencionados [48].

Otra medida de control adoptada fue la exclusión de la cadena alimentaria de aquellos materiales y tejidos procedentes de ovejas o cabras infectadas y que, por lo tanto, tienen una mayor probabilidad de presentar una mayor infectividad. A estos materiales se les conoce como MER (materiales específicos de riesgo) y entre ellos encontramos tanto el cerebro, médula espinal, ojos y amígdalas de animales mayores de 12 meses [50, 81].

Para finalizar, se están llevando a cabo distintos programas como pueden ser el uso del genotipado y los programas de cría basados en la selección genética de reproductores resistentes al scrapie. Consiste en conseguir en rebaños ovinos un aumento del alelo ARR, que está asociado con una mayor resistencia al scrapie clásico y minimizar la prevalencia de alelos como el VRQ y otros que estén asociados con una mayor susceptibilidad [38, 49].

1.3. Biomarcadores en enfermedades priónicas

Los biomarcadores utilizados para las encefalopatías espongiformes se pueden clasificar en tres grupos. En primer lugar, encontramos las proteínas priónicas y sus derivados, las cuales están directamente involucradas en la patogenia. Por otro lado, se encuentran los denominados marcadores sustitutos, que son liberados al sistema ventricular, sangre u otros fluidos a causa de la neurodegeneración y muerte neuronal. Por último, se sigue investigando sobre la posibilidad y viabilidad de utilizar biomarcadores

genéticos en el diagnóstico de las encefalopatías espongiformes, más en concreto el uso de microARN.

El primer grupo de biomarcadores, las proteínas priónicas y sus derivados, se utiliza tanto para el análisis total de PrP^C en el líquido cefalorraquídeo (LCR) como para la detección directa del agente causal, es decir, el prion. En cuanto al análisis total de PrP^C en el LCR se ha descrito que pacientes con ECJe tienen niveles más bajos de lo normal. La causa para que esto ocurra es todavía desconocida, pero se piensa que la disminución de los niveles de PrP^C en el LCR es consecuencia de haber una mayor acumulación y depósito en el tejido nervioso del cerebro [51-53]. Por otro lado, la detección del prion en el LCR a veces puede ser complicada debido a que se encuentra en niveles muy bajos, por lo que es necesario utilizar técnicas de amplificación para que así puedan alcanzarse niveles detectables.

En las enfermedades neurodegenerativas se desarrollan procesos como la degeneración sináptica [54]. Por ello, una de las estrategias más utilizadas y de las más estudiadas en el diagnóstico de encefalopatías espongiformes es la búsqueda y uso de biomarcadores que estén relacionados con este proceso. Dentro de este grupo podemos encontrar biomarcadores como la tau total, YKL-40, α 1-antiquimotripsina (ACT) o neurofilamentos de cadena ligera (NfL), que son marcadores de daño neuronal [55, 56].

Por último, se han desarrollado diferentes herramientas genómicas en los últimos años como el uso de micromatrices o la secuenciación en masa del transcriptoma [57, 58]. Estas herramientas lo que permiten es realizar comparaciones genómicas entre muestras de individuos sanos y enfermos o en diferentes fases de la enfermedad y así poder identificar aquellos genes envueltos en la patogénesis del prion que puedan servir tanto como biomarcadores en el diagnóstico de la patología o como diana en estrategias terapéuticas [59]. Teniendo en cuenta diferentes estudios genómicos que se han llevado a cabo en muestras del SNC procedentes, tanto de individuos infectados por patologías naturales como el scrapie como de modelos murinos adaptados a EET, se han identificado un gran número de genes expresados diferencialmente.

1.3.1. YKL-40

La activación de células microgliales y astrocitos es un punto destacado de numerosas enfermedades neurodegenerativas. No se tiene claro todavía si el hecho de que estos mecanismos se activen contribuye de algún modo al proceso neurodegenerativo o si, por otro lado, aparece como consecuencia de la patogenia de estas enfermedades [60]. Al ser la neuroinflamación un proceso que tiene lugar en la mayoría de estas patologías, aquellos biomarcadores de este proceso y de otros como la activación de la microglía destaca por su posible uso como futuros marcadores [61]. Dentro de los biomarcadores de procesos como la neuroinflamación y activación de la microglía estudiados, es la glicoproteína YKL-40 aquella que más destaca y está siendo investigada. Esta proteína también conocida como quitinasa-3-similar-1 (*Chitinase-3-like protein* en inglés o CHI3L1) es una glicoproteína perteneciente al grupo de la familia de proteínas similares a quitinasas en mamíferos. Es expresada y secretada por distintos tipos de células como macrófagos, condrocitos y células del músculo liso vascular [62-64]. Se ha observado que los niveles de YKL-40 en el LCR aumentan en la enfermedad de ECJe en comparación a otras enfermedades neurodegenerativas [65].

1.3.2. Antiquimotripsina (α 1- ACT)

La α 1-antiquimotripsina (ACT) es una proteína inhibidora de serina proteasa que se encuentra relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Se han encontrado elevados niveles de ACT en el LCR de pacientes con Alzheimer, ya que se ha demostrado su presencia en depósitos amiloides característicos de dicha enfermedad [69, 70]. Esta proteína no se ha estudiado en casos naturales de scrapie, no obstante, se ha detectado un incremento en la expresión del gen que codifica ACT en cerebros de ratones infectados con scrapie en fases preclínicas [72]. Además, en otro estudio observaron que, en cerebro de ratones infectados con tres cepas de scrapie, 263K-, 139A y ME7, los niveles de ACT aumentaban y que incrementaban conforme la enfermedad avanzaba [71]. Esto se encuentra correlacionado con el incremento que se produce de esta proteína en los depósitos de amiloide. Por otro lado, pese a no haber un gran número de artículos que relacionen la ACT

con las enfermedades priónicas, se ha demostrado que sus niveles aumentan de manera considerable en la orina de pacientes con ECJe y que además incrementa conforme avanza la enfermedad [72]. A raíz de todas estas evidencias la ACT se ha señalado como un posible e importante biomarcador de scrapie y otras enfermedades priónicas, sobre todo si se analiza en la orina.

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La hipótesis de la que se parte en este Trabajo Fin de Máster (TFM) es de la similitud existente entre enfermedades neurodegenerativas humanas y aquellas producidas en animales. Se conoce la etiología y patogenia de las EET que afectan a animales como el scrapie en ovejas y cabras o la encefalopatía espongiiforme bovina. Por otro lado, se conocen también diferentes EET humanas como la ECJe o el Kuru. Son un amplio número de enfermedades para las cuales no existe ningún tipo de cura o tratamiento y, el diagnóstico clínico que se suele llevar a cabo en fases avanzadas de la enfermedad no es útil en fases preclínicas. Por ello, la importancia de usar biomarcadores y de este modo poder detectar aquellas moléculas alteradas en animales infectados y así poder detectar las enfermedades en estadios preclínicos.

Por ello , el objetivo general de este TFM es analizar la acumulación de dos marcadores relacionados con las enfermedades neurodegenerativas humanas en muestras de encéfalo de ovejas infectadas por scrapie clínicas, pre-clínicas y controles sanos. Para alcanzar dicho objetivo, se establecen los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la posibilidad de utilizar biomarcadores como YKL-40 y ACT en ovejas para el diagnóstico de scrapie y confirmar que la patogenia de esta enfermedad es similar a la de otras enfermedades neurodegenerativas humanas.
- Incluir los resultados obtenidos dentro de un marco One Health y su importancia dentro de la salud global.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Aspectos éticos

Todos los procedimientos de este trabajo se han llevado a cabo bajo el proyecto con referencia PI17/21, aprobado por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza. El cuidado y uso de los animales se realizaron de acuerdo con el Real Decreto 53/2013, que cumple con la Directiva 2010/63 de la Unión Europea sobre la protección de animales utilizados en experimentación y otros fines científicos.

3.2. Animales seleccionados para el estudio

La colección de muestras y los detalles demográficos de los animales seleccionados fueron descritos en un estudio anterior [80]. Para la realización de este trabajo se han seleccionado 9 ovejas hembra de raza Rasa Aragonesa y de genotipo ARQ/ARQ para el gen *PRNP*. 3 de ellas estaban en fase clínica de la enfermedad, 3 en fase preclínica, es decir, antes de que mostrasen signos clínicos, y 3 eran controles negativos, ovejas sanas procedentes de un rebaño donde nunca se han detectado casos de scrapie.

3.3. Muestras

Las muestras obtenidas para este trabajo se obtuvieron de la sala de necropsias. El sacrificio de los animales se realizó mediante una inyección intravenosa de pentobarbital sódico. Se tomaron muestras del SNC, en concreto de la corteza frontal, ganglios basales, corteza parietal, hipocampo, tálamo, hipotálamo, mesencéfalo, óbex y médula espinal cervical en formaldehído al 10%, para su posterior análisis.

Las muestras de los tejidos mencionados se fijaron en formol y posteriormente se colocaron en cassettes para incluirse en parafina (HistoCore PEARL de Leika). A continuación, se realizaron 4 secciones de cada uno cortadas a 4 micras con un microtomo, se montaron en un portaobjetos de vidrio y se dejaron secar en una estufa a 56°C. Estas muestras se utilizaron para la detección inmunohistoquímica de la PrP^{Sc}, YKL-40 y ACT y para la tinción de hematoxilina-eosina.

3.4. Selección de anticuerpos y puesta a punto

Para la selección de anticuerpos que se han usado en este trabajo, se realizó una búsqueda de anticuerpos disponibles de diferentes casas comerciales, prestando especial atención a aquellas especies para las que está diseñado el anticuerpo, la especie huésped en la que se desarrollan y su aplicación para inmunohistoquímica con muestras incluidas en parafina.

Puesto que la mayoría de los anticuerpos encontrados estaban diseñados para su uso en humanos, se buscó la similitud entre las secuencias de aminoácidos entre las dos proteínas en humano y en oveja y determinar si este anticuerpo es susceptible de unirse a la proteína ovina.

Para poner a punto los anticuerpos, se usó una muestra de encéfalo ovino de diferentes áreas, y se realizaron pruebas con concentraciones diferentes. Tras realizar las pruebas, se seleccionó la dilución 1:150 tanto para YKL-40 como para ACT.

3.5. Inmunohistoquímica para YKL-40 y ACT

Tras esto, se realiza el desparafinado de las muestras. Para ello, se colocan las muestras en una cestilla y se sumergen en xilol durante 5 minutos, repitiendo esto dos veces. A continuación, se introducen en etanol al 99% y se vuelve a sumergir dos veces durante 5 minutos, después en etanol al 96% durante 3 minutos y etanol al 70% otros 3 minutos. Para finalizar, se dejan las preparaciones en agua destilada durante 5 minutos.

Tras haber realizado el desparafinado, se procede a realizar el desenmascaramiento de epítomos o recuperación antigénica mediante un tratamiento térmico con PT-Link. Para esto, se pasan las muestras a unos soportes y se incuban en un PT-Link (Dako) con buffer citrato de pH 6 (Target retrieval Solution low pH, EnVision FLEX, Dako) a 96°C durante 30 minutos. A continuación, se pasan las muestras a una solución de lavado (Wash buffer, EnVision FLEX, Dako) y se dejan durante 20 minutos para que se atemperen, posteriormente las muestras se montan en un soporte adecuado para la realización de la técnica de inmunohistoquímica manual.

Posterior al montaje, se vuelve a realizar un lavado con Wash buffer (Tris-Buffered Saline + 1% Tween) y se realiza el bloqueo de la peroxidasa endógena, para lo que se tiene que añadir 200 µl de solución de bloqueo (Peroxidase - Blocking Solution, Dako) en cada muestra y dejar actuar durante 5 minutos. Para finalizar, se realizan 3 lavados con Wash buffer de 5 minutos cada uno.

A continuación, se incuba 200 µl de anticuerpo primario en el diluyente comercial (Dako Flex Antibody Diluent), a una concentración de 1:150 tanto para YKL-40 como para ACT, posteriormente se tapa con parafilm para evitar cualquier posible evaporación y se deja actuar *overnight*.

Al día siguiente, se saca el rack y se realizan 3 lavados con Wash buffer de 5 minutos cada uno.

Se incuba el anticuerpo secundario, añadiendo de nuevo 200 µl de producto (Dako EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Rabbit) a cada muestra y dejándolo actuar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se vuelven a realizar 3 lavados con Wash buffer de 5 minutos.

Para el revelado con DAB Plus (Liquid DAB + Substrate Chromogen System, Dako), se ha de añadir 1 gota de cromógeno por cada mililitro de buffer. Se echa 200 µl de DAB a cada muestra sobre el tejido. Se deja incubar durante 10 minutos y se lava con agua destilada.

Se pasan las muestras a una cestilla con agua destilada y se comienza la tinción. Para ello, las preparaciones se pasan a una cubeta con hematoxilina durante 5 minutos y posteriormente a otra cubeta con agua destilada. Se dejan debajo del grifo hasta eliminar el exceso de hematoxilina.

Para deshidratar las muestras hay que realizar 3 inmersiones en alcohol al 70%, al 96% al 100% durante 2 veces, posteriormente xilol y por último en una cubeta con xilol se deja durante un mínimo de 5 minutos. Para finalizar, se montan las muestras colocando una gota de pegamento y un cubre sobre el tejido.

3.6. Inmunohistoquímica para PrP^{Sc}

El protocolo aplicado para la IHQ de la PrP^{Sc} fue idéntico al empleado para YKL-40 y ACT. La única variación fue que, previo al tratamiento térmico con PT-Link, durante el desenmascaramiento de epítomos, es necesario realizar un pretratamiento y una digestión con PK. Para esto, primero se introducen las muestras en ácido fórmico al 98% durante 15 minutos. Una vez pasado este tiempo se lavan con agua del grifo durante 10 minutos. A continuación, se lleva a cabo la digestión con proteasa K (PK) a 4µg/ml durante 15 minutos a 37°C. Pasado este tiempo se sacan las muestras y se pasan a una nueva cubeta con agua destilada para limpiarlas. Como anticuerpo primario se utilizó el L42 a una dilución de 1:500.

El resto del protocolo se siguió del mismo modo que para YKL-40 y ACT.

3.7. Tinción Hematoxilina-Eosina

Se realizó la tinción de hematoxilina-eosina para de este modo poder observar la vacuolización en las distintas áreas del encéfalo estudiadas.

Con las muestras colocadas en una cestilla se introducen durante 4 minutos en una cubeta con xilol y luego se pasan a otra distinta con xilol otros 4 minutos. Pasado este tiempo, se pasan dos veces por alcohol al 100% 1 minuto cada una. Seguidamente se sumergen en alcohol al 96% durante 1 minuto, luego alcohol al 70% otro minuto y después se dejan bajo agua del grifo durante 1 minuto. Tras esto, se tiñen con hematoxilina durante 5 minutos y se vuelve a dejar debajo de agua del grifo durante 1 minuto en un recipiente nuevo. Posteriormente se introduce en alcohol ácido al 0,5% durante 2 minutos y por eosina otros 2 minutos. Pasado este tiempo las muestras se introducen en alcohol al 100% dos veces durante 1 minuto. A continuación, se deja otro minuto en xilol para luego dejar con xilol durante mínimo 5 minutos. Para finalizar, se montan las muestras colocando una gota de pegamento y un cubre sobre el tejido.

3.8. Valoración microscópica

Una vez realizada la detección inmunohistoquímica de las proteínas se llevó a cabo una valoración semicuantitativa al microscopio (Zeiss Axioskop 40) tanto de la intensidad del depósito de YKL-40, ACT, PrP^{Sc} como de la vacuolización de 0 a 5 en las áreas estudiadas.

Para valorar las muestras, se estableció una escala previamente del 0 al 5 de modo que se les asignó a las muestras una puntuación de 0 si no había presencia de tinción en el tejido; puntuación de 1 si se veían pocas células teñidas y con poca intensidad; puntuación de 2 cuando se observaban en la muestra bastantes células teñidas, pero con poca intensidad o pocas células teñidas intensamente; puntuación de 3 para aquellas muestras en las que se veían la mitad de las células teñidas y la otra mitad sin teñir; puntuación de 4 cuando se observaban muchas células teñidas con gran intensidad; y una puntuación de 5 cuando todas las células presentes en el área estudiada estaban teñidas intensamente.

Esta valoración se realizó en las distintas áreas del encéfalo estudiadas para posteriormente analizar la cantidad de depósito en cada una de ellas y poder extraer conclusiones.

3.9. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism versión 10.2.3. Los datos se establecieron en una tabla agrupada por estadios de enfermedad y áreas. Se obtuvo la media y desviación estándar de cada área y cada grupo y se valoró la normalidad mediante el test de Shapiro-Wilk (normal, $p > 0.05$), por el que se obtuvo la normalidad de la distribución.

Tras haber hecho esto, se utilizó el test estadístico two-way ANOVA (en español, ANOVA o análisis de varianza de dos factores), seguido por el test de comparaciones múltiples de Tukey. Este último indicó aquellos valores que mostraban diferencias significativas mediante una comparación entre los 3 grupos de ovejas: clínicas, preclínicas y negativas.

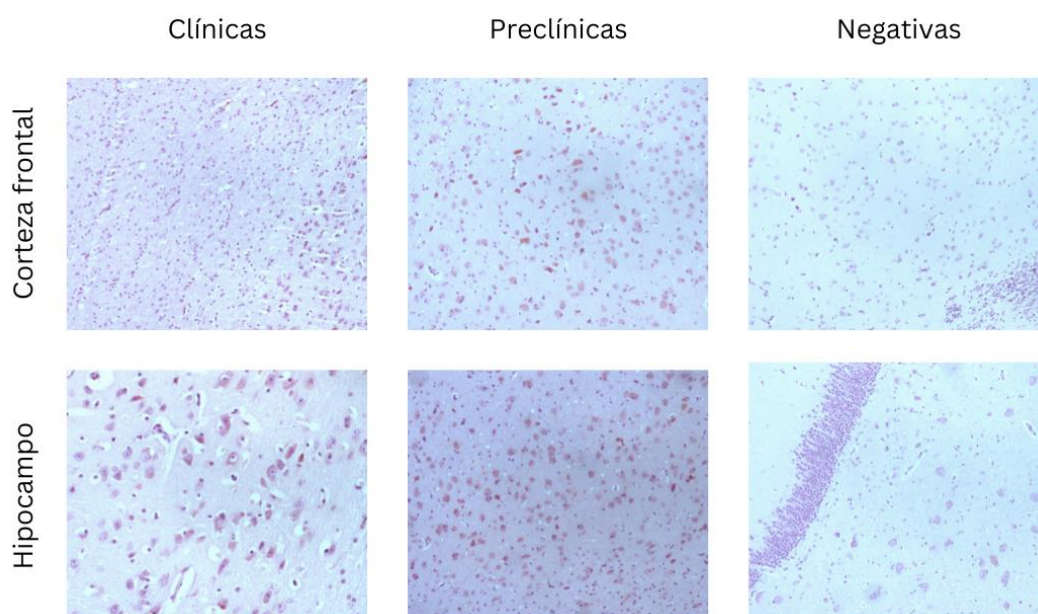
3.10. Toma de fotografías

Se observaron al microscopio (Zeiss Axioskop 40. Cámara integrada AxioCam MRc 5 Zeiss) las muestras para hacer las fotos incluidas en este trabajo (Software: AxioVision versión 4.6.3.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3. Depósito y acumulación de YKL-40 en las distintas áreas del encéfalo

La glicoproteína YKL-40 se encuentra en posición de ser un buen biomarcador para las enfermedades priónicas. La hipótesis más respaldada es el papel que tiene en el proceso de inflamación al intervenir en la diferenciación y maduración de macrófagos. Es por esto por lo que se considera su capacidad como biomarcador de la neuroinflamación, fenómeno que aparece durante la patogenia de las enfermedades priónicas. Tras realizar la inmunotinción para la detección de YKL-40 se observó un marcaje principalmente intraneuronal y, en algunas áreas como el óbex y la médula espinal cervical, también se detectó en el neuropilo. En general, tanto la intensidad de la tinción como el número de células inmunopositivas fue mayor en el grupo de ovejas clínicas (Figura 1).



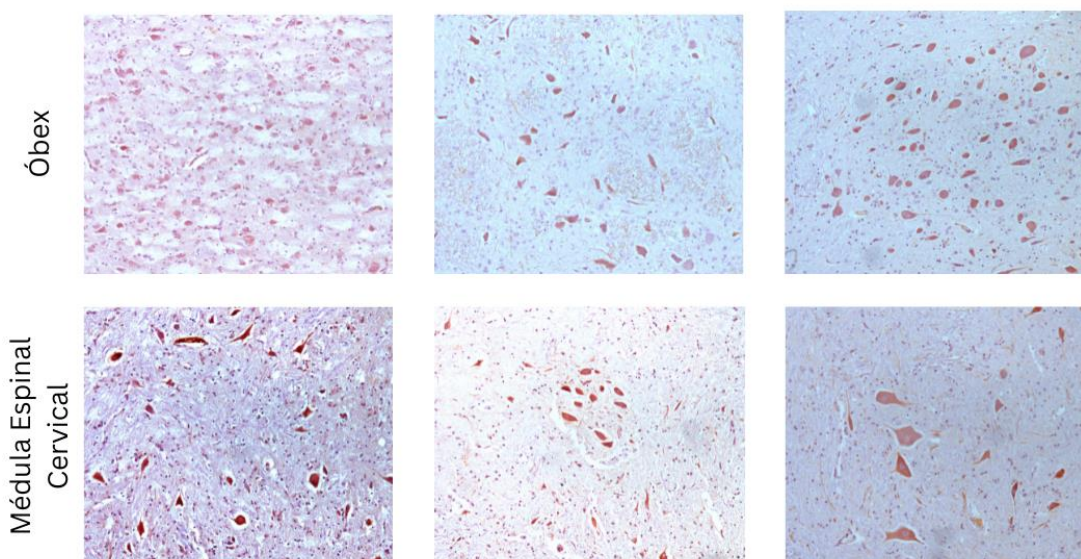


Figura 1. Imágenes representativas de los depósitos y acumulación de YKL-40 en la corteza frontal, hipocampo, óbex y médula espinal cervical de ovejas infectadas por scrapie (clínicas y preclínicas) y ovejas sanas.

En cuanto a las muestras de los ganglios basales, corteza parietal, hipocampo y tálamo no hubo ningún tipo de depósito o acumulación de YKL-40 en el grupo de las ovejas negativas (Figura 2B). Asimismo, no se determinó presencia de la proteína ni en la corteza parietal ni en tálamo de ovejas preclínicas (Figura 2C). Por otro lado, ni en la corteza frontal ni en el cerebelo hubo depósito de la proteína en las ovejas clínicas (Figura 2D). Fueron la corteza frontal y corteza parietal aquellas áreas en las que se encontró un menor depósito de YKL-40. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los depósitos de YKL-40 encontrados en ganglios basales, hipocampo y tálamo entre ovejas clínicas y negativas ($*p < 0,05$). Además, también hubo diferencias significativas en los ganglios basales e hipocampo entre las ovejas preclínicas y negativas ($*p < 0,05$) (Figura 2A).

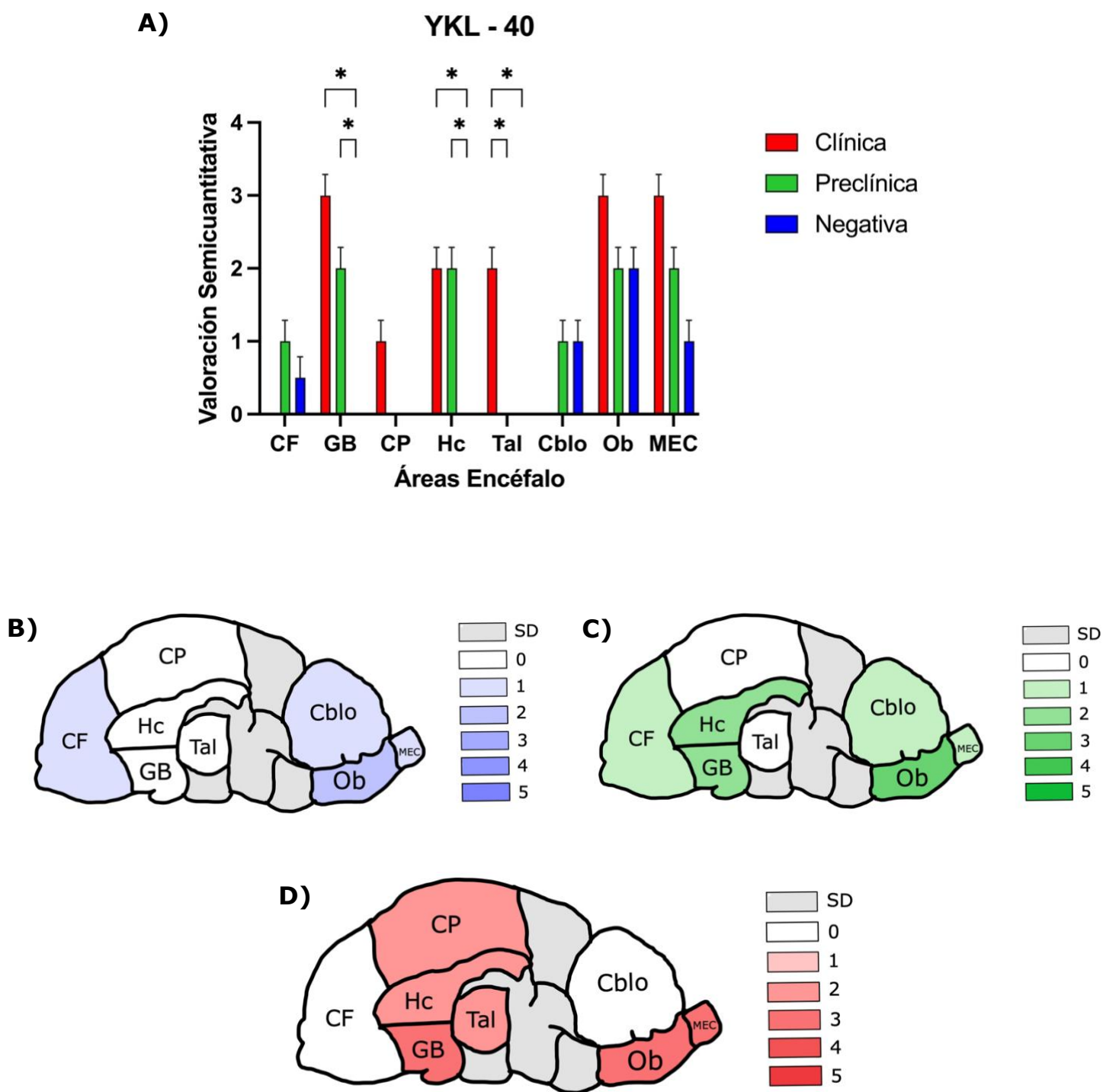


Figura 2. Análisis de acumulación de YKL-40 en el encéfalo de ovejas clínicas, preclínicas y negativas. **A)** Comparación del depósito de YKL-40 en 3 ovejas clínicas, 3 ovejas preclínicas y 3 ovejas negativas, mediante valoración semicuantitativa, siguiendo una puntuación del 0 (ausencia de depósito) al 5 (depósito muy intenso) en 8 áreas distintas del encéfalo: corteza frontal (CF), ganglios basales (GB), corteza parietal (CP), hipocampo (Hc), tálamo (Tal),

cerebelo (Cblo), óbex (Ob), y médula espinal cervical (MEC). Se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio en 3 áreas diferentes: ganglios basales, hipocampo y tálamo (* $p < 0,05$; test ANOVA de dos factores con test de comparaciones múltiples Tukey). Los mayores depósitos de YKL-40 se encontraron en ganglios basales y médula espinal cervical de ovejas clínicas y en el óbex tanto de ovejas clínicas como preclínicas. **B)** Representación del depósito de YKL-40 para el grupo de ovejas negativas. **C)** Representación del depósito de YKL-40 para el grupo de ovejas preclínicas. **D)** Representación del depósito de YKL-40 para el grupo de ovejas clínicas.

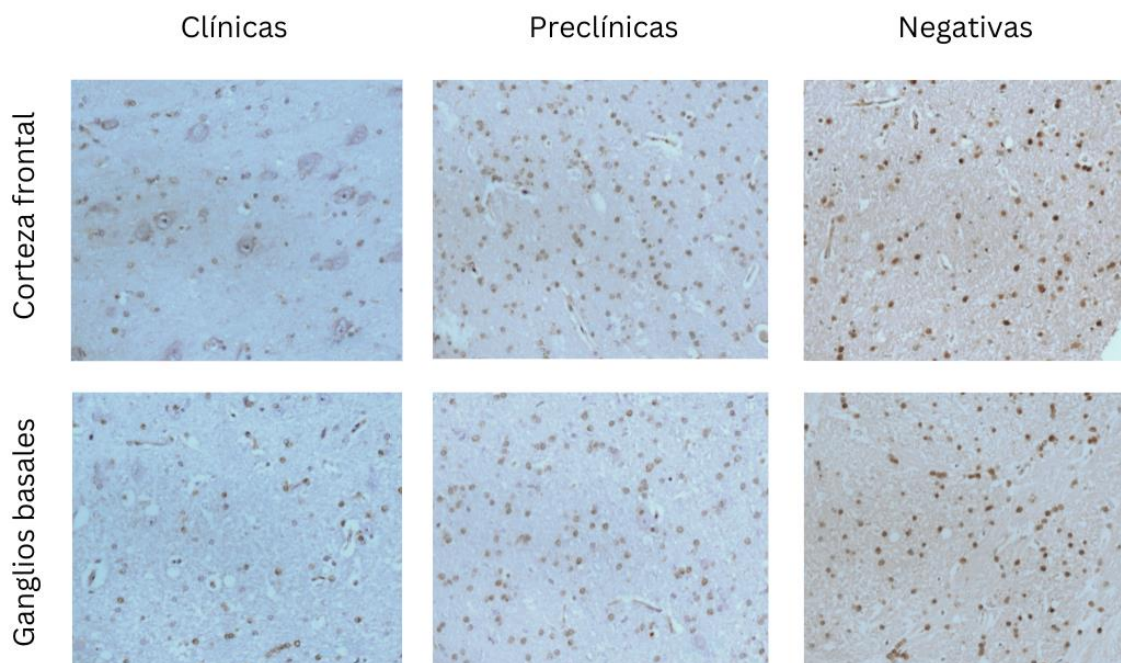
En algunas áreas cerebrales se observa un aumento del depósito y acumulación de YKL-40 en el grupo de ovejas clínicas respecto a las negativas. Esto sugiere que puede existir una asociación entre la cantidad de proteína depositada con la progresión de la enfermedad. De manera similar, se ha observado en un estudio con modelos murinos de scrapie un incremento de los niveles de RNAm YKL-40 en el cerebro de animales infectados en las fases preclínicas y clínicas de la enfermedad [73], lo que concuerda con los resultados obtenidos. En otro estudio sobre la esclerosis lateral amiotrófica, se observó también un incremento en los niveles de YKL-40 en aquellos pacientes que padecían dicha enfermedad al compararse con los controles sanos [66]. Existen estudios en los que se observó un aumento de los niveles de YKL-40 en el LCR de pacientes afectados por enfermedades neurodegenerativas como ECJe, IFF y Alzheimer. En uno de dichos estudios [73] detectaron depósitos de YKL-40 en el tálamo solo en el estadio preclínico de la enfermedad, mientras que en el estudio presente solo se encontraron niveles de YKL-40 en esta área cerebral en la etapa clínica. Esto puede estar relacionado con la hipótesis de que las áreas en las que ocurre el depósito dependen de la enfermedad que se esté estudiando ya que, se ha observado una sobreexpresión de YKL-40 en el cerebelo de ratones infectados con ECJe mientras que en modelos murinos de Alzheimer no se detecta esta proteína en el cerebelo [73]. Por otro lado, las áreas en las que se observa depósito o acumulación de YKL-40 en las fases preclínicas o en ovejas negativas pero que luego se encuentran ausentes en el estado clínico de la enfermedad, como la corteza frontal, hipocampo, ganglios basales y cerebelo, pueden

deberse a la subsiguiente neurodegeneración y a su desplazamiento y presencia en el LCR.

4.4. Depósito y acumulación de α 1-Antiquimotripsina en las distintas áreas del encéfalo

La α 1-antiquimotripsina (ACT) es una proteína que se encuentra relacionada con la respuesta inflamatoria y, además se localiza en las placas de amiloide presentes en pacientes de Alzheimer [74]. No se tiene clara aún la relación que puede haber entre el scrapie y la presencia de ACT debido a la falta de estudios al respecto, pero sí que se ha observado en algunas investigaciones el aumento de esta proteína en el suero de pacientes con demencia senil del tipo Alzheimer conforme va avanzando la enfermedad [75].

Tras realizar la inmunotinción se observó un marcaje intranuclear, fundamentalmente localizado en células gliales. La tinción es mucho más intensa de manera generalizada en todas las áreas encefálicas del grupo de ovejas negativas en comparación a las infectadas. (Figura 3).



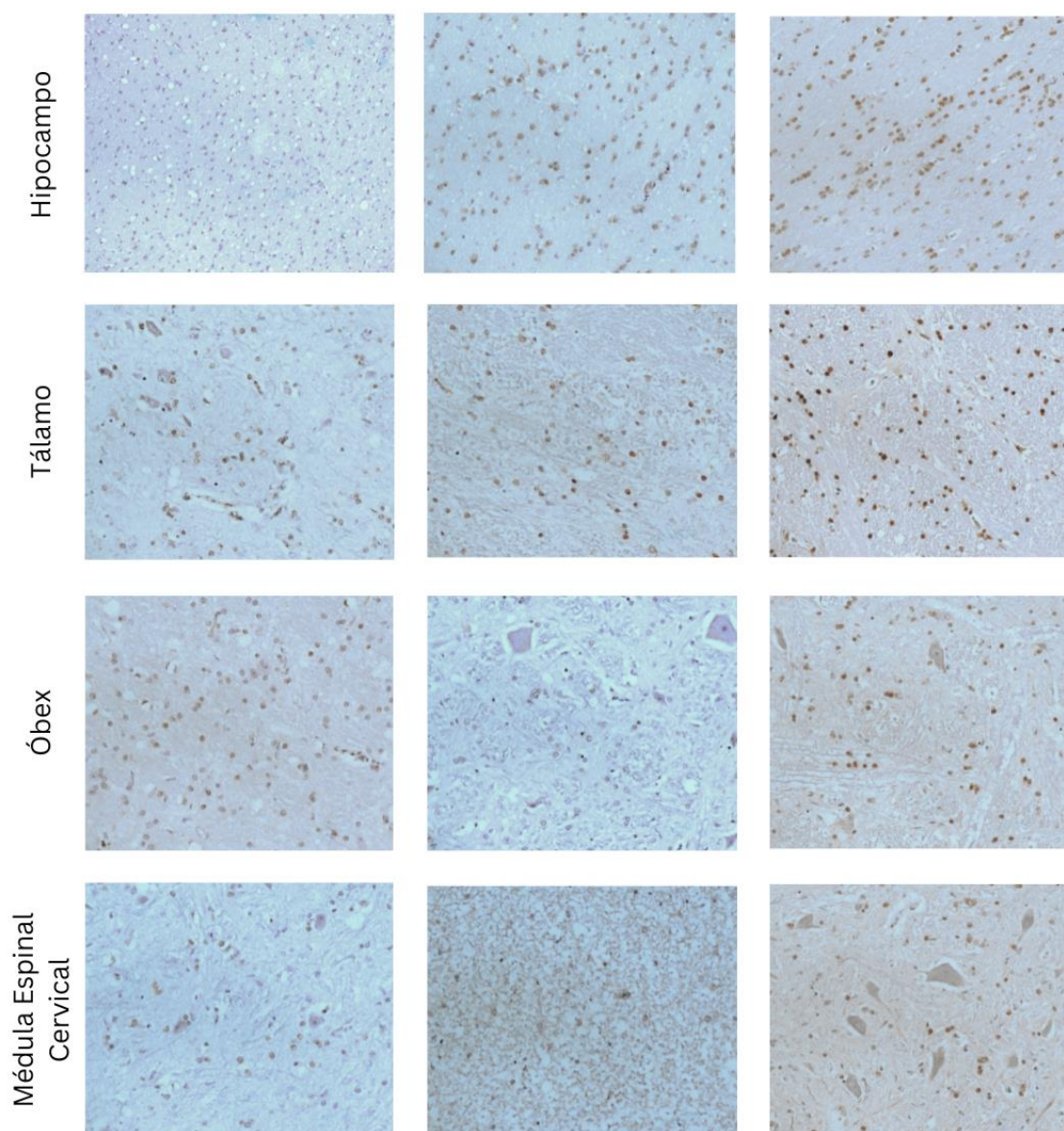


Figura 3. Imágenes representativas de los depósitos y acumulación de ACT en la corteza frontal, ganglios basales, hipocampo, tálamo, óbex y médula espinal cervical de ovejas infectadas por scrapie (clínicas y preclínicas) y ovejas sanas.

Las áreas que se valoraron con un mayor depósito y acumulación de ACT fueron la corteza frontal, ganglios basales, hipocampo y tálamo de ovejas negativas (Figura 4B). Por otro lado, la corteza parietal y médula espinal cervical presentan la valoración más baja en ovejas clínicas y ésta segunda área también en el grupo de ovejas preclínicas (Figura 4C). En general, se

observa que es el grupo de ovejas negativas el que presenta una mayor acumulación de ACT en casi todas las muestras analizadas y, que conforme avanza la enfermedad, dichos depósitos disminuyen encontrándose una menor acumulación en el grupo de ovejas clínicas (Figura 4D).

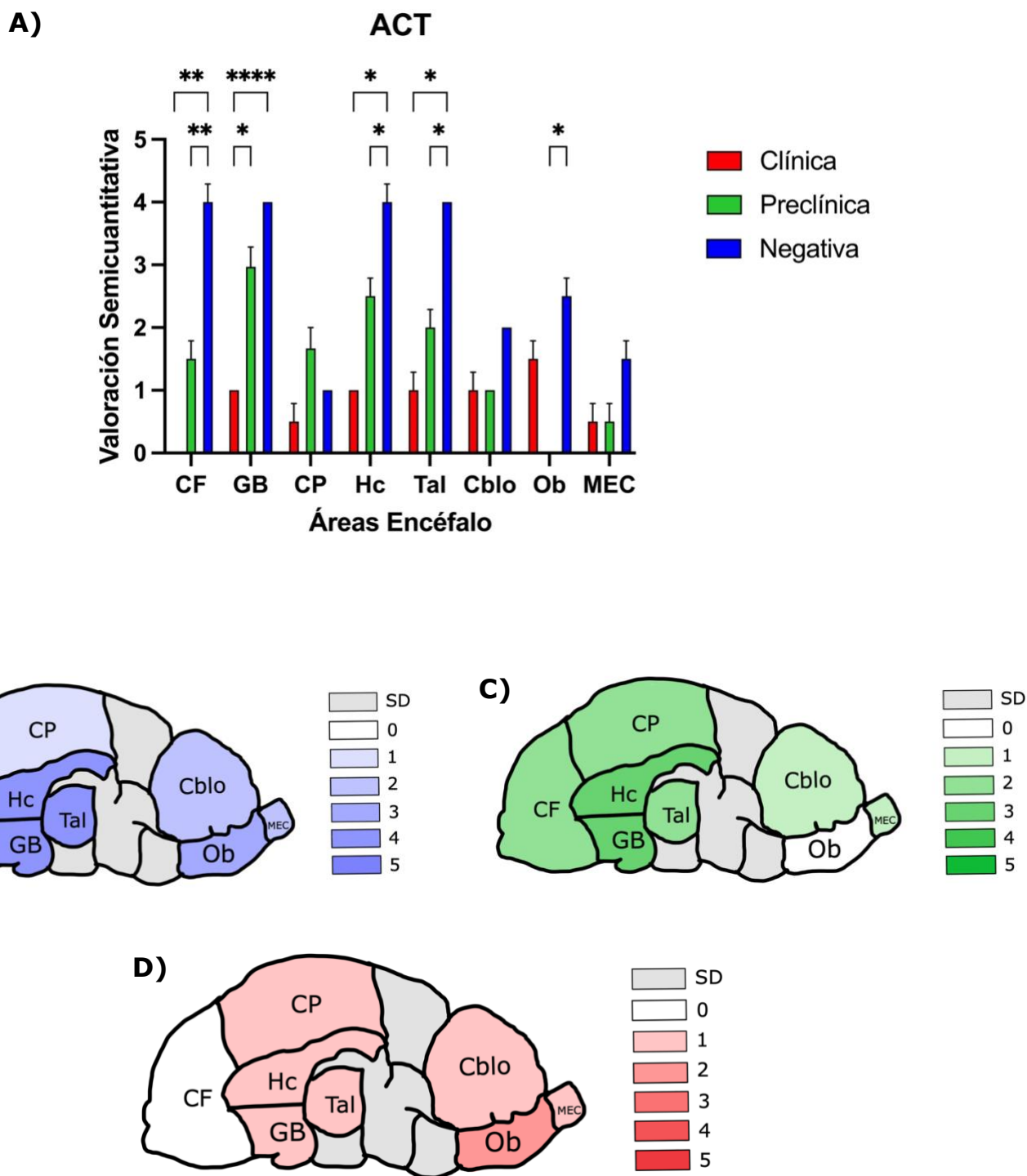


Figura 4. Análisis de acumulación de ACT en el encéfalo de ovejas clínicas, preclínicas y negativas. **A)** Comparación del depósito de YKL-40 en 3 ovejas

clínicas, 3 ovejas preclínicas y 3 ovejas negativas, mediante valoración semicuantitativa, siguiendo una puntuación del 0 (ausencia de depósito) al 5 (depósito muy intenso) en 8 áreas distintas del encéfalo: corteza frontal (CF), ganglios basales (GB), corteza parietal (CP), hipocampo (Hc), tálamo (Tal), cerebelo (Cblo), óbex (Ob), y médula espinal cervical (MEC). Se observaron diferencias significativas entre los distintos grupos de estudio en 5 áreas diferentes: corteza frontal, ganglios basales, hipocampo, tálamo y óbex (* $p < 0,05$; test ANOVA de dos factores con test de comparaciones múltiples Tukey). Los mayores depósitos de YKL-40 se encontraron en ganglios basales y médula espinal cervical de ovejas clínicas y en el óbex tanto de ovejas clínicas como preclínicas. **B)** Representación del depósito de ACT para el grupo de ovejas negativas. **C)** Representación del depósito de ACT para el grupo de ovejas preclínicas. **D)** Representación del depósito de ACT para el grupo de ovejas clínicas.

Hasta la fecha no existen investigaciones que relacionen de manera directa la ACT y el scrapie, la mayoría de los estudios se han realizado enfocadas en otras enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer o la ECJe. Este biomarcador se suele localizar en los depósitos de placas amiloides que se encuentran en pacientes con Alzheimer, enfermedad que también se encuentra asociada con una respuesta neuroinflamatoria. Es por esto por lo que existen numerosas investigaciones en las que se relacionan los niveles de ACT tanto en el LCR [75, 76] como en suero [77,78] de pacientes con Alzheimer. En un estudio más reciente en la que se corroboró que los pacientes con Alzheimer tienen unos niveles más elevados de ACT en el LCR se llegó también a la conclusión de que el uso de este biomarcador podría tener mayor utilidad en el monitoreo del avance de la enfermedad más que en su uso como método diagnóstico [79]. También se ha investigado sobre esta proteína en otros fluidos corporales. En un estudio realizado en 2008 donde analizaron la orina de pacientes que sufrían ECJe observaron que los niveles de ACT aumentaban conforme avanzaba la enfermedad. El estudio de técnicas que permitan diagnosticar la enfermedad a partir de este tipo de fluidos biológicos permitiría el desarrollo de métodos diagnósticos menos invasivos e incluso más sensibles [72].

Todos los resultados mencionados pueden explicar los obtenidos en el presente estudio ya que los mayores depósitos de ACT en el encéfalo se encuentran en el grupo de ovejas negativas y conforme avanza la enfermedad los niveles son menores, ya que a medida que se produce la neurodegeneración, la proteína al LCR, encontrando los valores más bajos en las muestras encefálicas de ovejas clínicas.

4.1. Depósito y acumulación de PrP^{Sc} en las distintas áreas del encéfalo

Con la finalidad de evaluar la acumulación y el depósito de PrP^{Sc} en distintas áreas del encéfalo de ovejas clínicas, preclínicas y negativas y determinar si existen diferencias significativas entre ellos, se llevó a cabo un análisis estadístico tras realizar una valoración semicuantitativa (Figura 5A).

No se observó ningún tipo de depósito o acumulación en el grupo de ovejas negativas (Figura 5B). En cuanto a la distribución de la PrP^{Sc} en el encéfalo de las ovejas infectadas (tanto clínicas como preclínicas) es el óbex el área que presenta un depósito más intenso en comparación al resto en el que las valoraciones fueron muy bajas (Figura 5C). En las ovejas clínicas también se observaron depósitos abundantes de PrP^{Sc} en el tálamo (Figura 5D).

Como se ha mencionado anteriormente, el depósito y acumulación de la proteína patológica es el mecanismo patogénico principal de las enfermedades priónicas. En las ovejas estudiadas las áreas encefálicas que presentan una mayor acumulación de PrP^{Sc} son el óbex y el tálamo (Figura 5A). Existen estudios donde se ha analizado el depósito en el cerebelo llegando a la conclusión que los elevados niveles de la proteína patológica en esta región se deben a la acción de las células gliales y al desarrollo de la neuroinflamación [68]. Estas variaciones están condicionadas y justificadas con las diferentes cepas priónicas, razas y genotipos de los animales en los que se analizan las muestras, ya que la susceptibilidad es distinta y condiciona dichos resultados [67, 82].

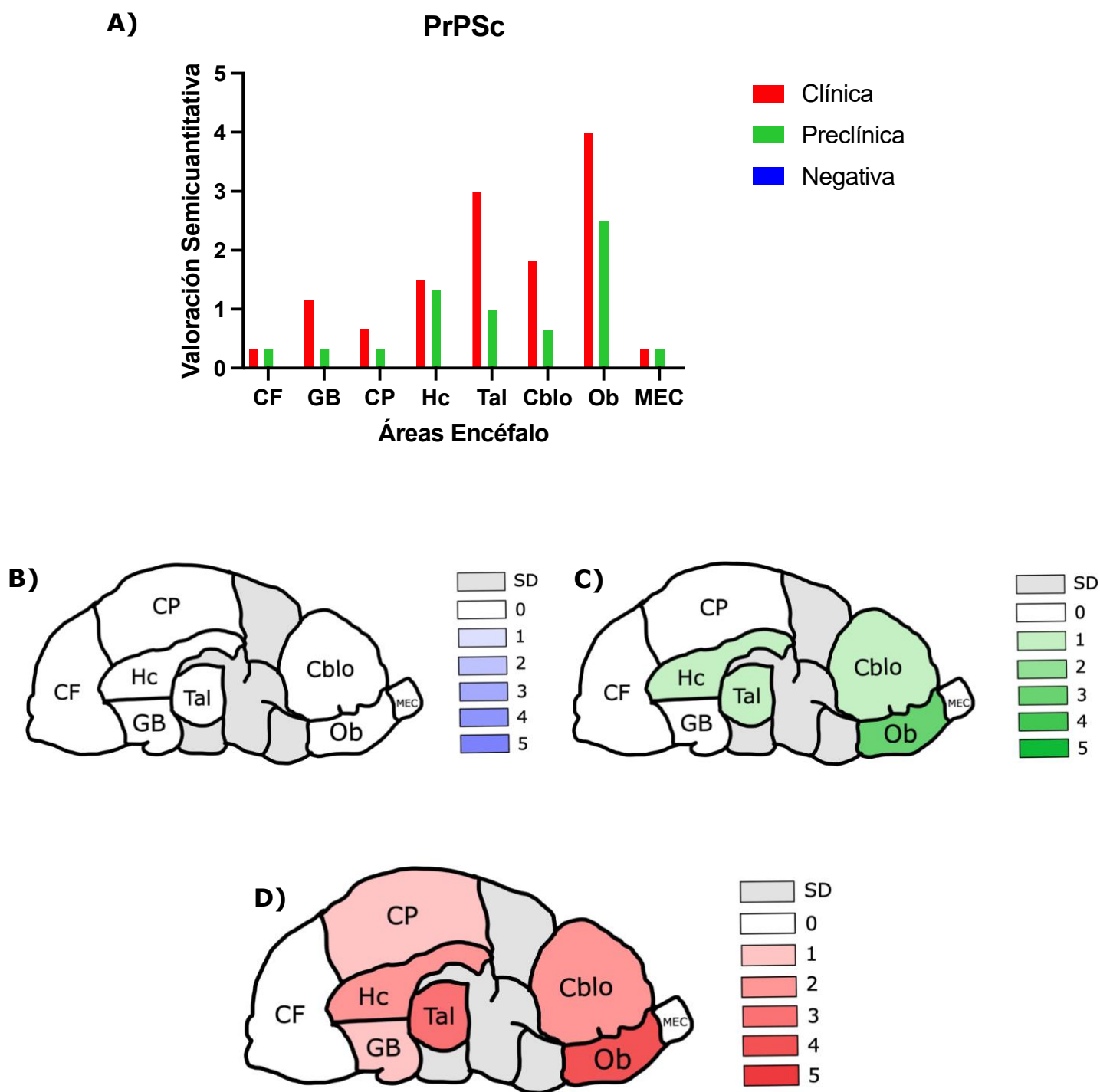


Figura 5 Análisis de acumulación de PrP^{Sc} en el encéfalo de ovejas clínicas, preclínicas y negativas. **A)** Comparación del depósito de PrP^{Sc} en 3 ovejas clínicas, 3 ovejas preclínicas y 3 ovejas negativas, mediante valoración semicuantitativa, siguiendo una puntuación del 0 (ausencia de depósito) al 5 (depósito muy intenso) en 8 áreas distintas del encéfalo: corteza frontal (CF), ganglios basales (GB), corteza parietal (CP), hipocampo (Hc), tálamo (Tal),

cerebelo (Cblo), óbex (Ob), y médula espinal cervical (MEC). **B)** Representación del depósito de PrP^{Sc} para el grupo de ovejas negativas. **C)** Representación del depósito de PrP^{Sc} para el grupo de ovejas preclínicas. **D)** Representación del depósito de PrP^{Sc} para el grupo de ovejas clínicas.

Si se comparan las áreas en las que ha habido una mayor acumulación de YKL-40 y ACT con aquellas en las cuales se ha encontrado un depósito más elevado de PrP^{Sc}, no se observa ningún patrón o coincidencia que destaque. Es cierto que hay un depósito generalizado de PrP^{Sc}, así como de ambos biomarcadores en las zonas de corteza parietal, ganglios basales, hipocampo, tálamo y óbex, pero no se ven similitudes a nivel de intensidad del depósito. El óbex es la única área en la que se observa una intensa acumulación tanto para la PrP^{Sc} como ambos marcadores, siendo un poco menos intenso en el caso de ACT.

4.2. Vacuolización presente en las distintas áreas del encéfalo

La vacuolización es un proceso característico de las encefalopatías espongiiformes que le proporciona al tejido nervioso un aspecto espongiiforme. Además, la vacuolización es un proceso que comienza al final de la fase preclínica y se desarrolla durante el estado clínico de la enfermedad [68, 67]. Para hacer posible la detección y el análisis de dicho proceso en las muestras de ovejas se llevó a cabo la tinción de hematoxilina-eosina ya que permite colorear los núcleos y citoplasma de las células y permite detectar así fácilmente la vacuolización.

Del mismo modo que ha ocurrido en la determinación de depósito y acumulación de PrP^{Sc}, no se ha observado ningún tipo de vacuolización en el grupo de ovejas negativas (Figura 6B). En cuanto al grupo de ovejas preclínicas se observó una mayor vacuolización en el óbex y, de manera similar también en el mesencéfalo, tálamo, ganglios basales y corteza parietal (Figura 6C). Aunque los niveles fueron parecidos entre el grupo clínico y preclínico (Figura 6A), éste primero siempre presentaba unos valores más elevados siendo el óbex el área cuya valoración fue la más alta (Figura 6D).

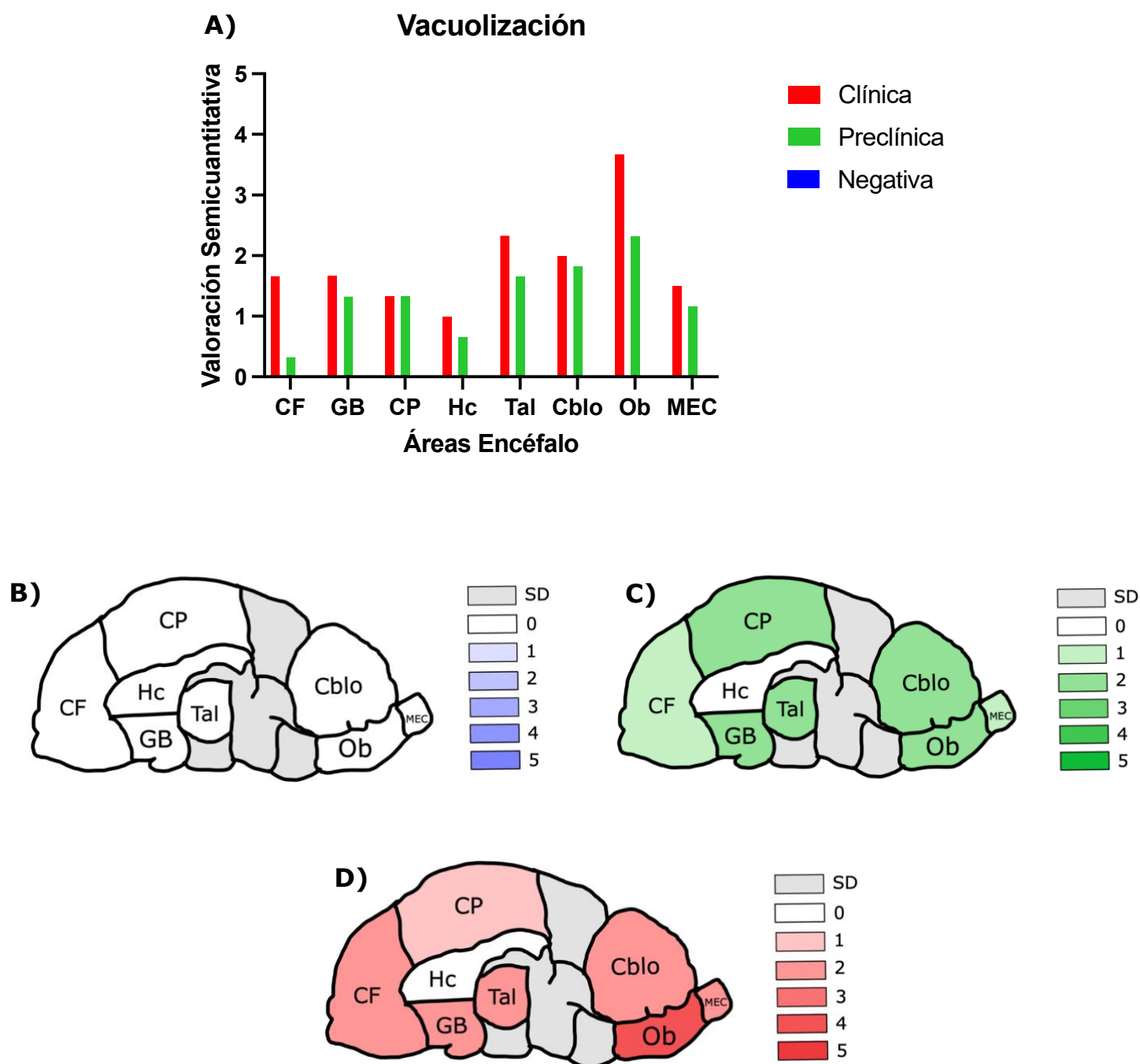


Figura 6. Análisis de la vacuolización presente en el encéfalo de ovejas clínicas, preclínicas y negativas. **A)** Comparación del depósito de PrP^{Sc} en 3 ovejas clínicas, 3 ovejas preclínicas y 3 ovejas negativas, mediante valoración semicuantitativa, siguiendo una puntuación del 0 (ausencia de depósitos) al 5 (depósito muy intenso) en 8 áreas distintas del encéfalo: corteza frontal (CF), ganglios basales (GB), corteza parietal (CP), hipocampo (Hc), tálamo (Tal), cerebelo (Cblo), óbex (Ob), y médula espinal cervical (MEC). **B)** Representación de la vacuolización para el grupo de ovejas negativas. **C)**

Representación de la vacuolización para el grupo de ovejas preclínicas. **D)**
Representación de la vacuolización para el grupo de ovejas clínicas.

De nuevo, no se encuentra ningún tipo de patrón a primera vista si se compara la vacuolización observada en las distintas áreas del encéfalo y los niveles de YKL-40 y ACT detectados. No obstante, si se comparan los resultados obtenidos para la vacuolización de ovejas clínicas con la valoración en el depósito de ACT en el grupo de ovejas negativas (que es el grupo donde se ha visto un mayor depósito para este biomarcador), a excepción del hipocampo, el resto de las áreas comparten una distribución e intensidad similar. Este patrón encontrado podría ser de utilidad para facilitar el diagnóstico del scrapie, así como su comprensión y, además ser una posible futura vía de investigación.

4.5. Futuras vías de investigación en un marco One Health

Como se ha podido observar a lo largo de este estudio, existe una estrecha relación en cuanto a la patogenia entre las enfermedades priónicas que se dan en humanos y las que padecen los animales. La principal característica es la presencia de la PrP^C con su posterior transformación en la isoforma patológica, acompañada de la reacción de neuroinflamación.

El estudio en modelos animales sobre el scrapie o las encefalopatías espongiiformes pueden ayudar a entender mejor las enfermedades neurodegenerativas humanas como el Alzheimer o el Parkinson. Se ha mencionado en cuanto a la ACT la falta de estudios en el scrapie, pero destacan las investigaciones que se han llevado a cabo en distintos fluidos humanos y esta es una de las futuras vías de investigación que se puede tener en cuenta. Así pues, este representa un estudio piloto en muestras de encéfalo que debería ser complementado con la determinación de YKL-40 y ACT en fluidos, como el LCR, de ovejas en distintos estadios de la enfermedad con el fin de conocer su valor diagnóstico.

Este estudio ha servido para poner a punto la prueba inmunohistoquímica de dos biomarcadores como son YKL-40 y ACT al observarse depósitos en distintas áreas del encéfalo de ovejas clínicas, preclínicas y negativas. También se ha conseguido representar gráficamente aquellas áreas donde se

produce una mayor o menor intensidad de la acumulación de estos marcadores, algo que hasta la fecha no se había realizado en ovino con scrapie. Esto a su vez, puede sentar las bases para seguir por esta vía en la búsqueda de nuevos biomarcadores que faciliten la detección de enfermedades priónicas como puede ser el scrapie y, además de un modo no tan invasivo.

5. CONCLUSIONES

Partiendo del análisis de los resultados obtenidos a lo largo de los distintos experimentos realizados en este TFM, es posible extraer las siguientes conclusiones:

- La puesta a punto de los protocolos para aplicar la técnica inmunohistoquímica para los marcadores YKL-40 y ACT ha sido favorable, ya que se ha logrado la detección de ambas proteínas en encéfalos ovinos y se ha podido realizar su valoración semicuantitativa
- Se ha corroborado la similitud entre la patogenia del scrapie con la de otras enfermedades neurodegenerativas humanas mencionadas como pueden ser el Alzheimer o Parkinson al encontrar semejanzas en los resultados obtenidos sobre los depósitos de las distintas proteínas y en el encéfalo.
- Es importante continuar con esta vía de investigación y realizar más estudios sobre la distribución de estos biomarcadores utilizando un mayor número de muestras. Asimismo, es necesario continuar este estudio determinando estos marcadores en biofluidos de ovejas en distintos estadios clínicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Badiola JJ, Pumarola M (2010) Encefalopatías espongiformes transmisibles. Ediciones Mayo S.A.
2. Pérez A, Filali H, Monzón M. El agente causal de las encefalopatías espongiformes transmisibles en Badiola JJ, Pumarola M (2010) Encefalopatías espongiformes transmisibles. Ediciones Mayo S.A. 9-20
3. Mabbott NA (2017) How do PrPSc prions spread between host species, and within hosts? *Pathogens* 6:1-41
4. Imran M, Mahmood S (2011) An overview of human prion diseases. *Virology Journal* 8:1-9
5. Hughes D, Halliday M (2017) What is our current understanding of PrPSc-associated neurotoxicity and its molecular underpinnings? *Pathogens* 6:1-22
6. Nicholson EM, Brunelle BW, Richt JA, Kehrli ME, Greenlee JJ (2008) Identification of a heritable polymorphism in bovine PRNP associated with genetic transmissible spongiform encephalopathy: Evidence of heritable BSE. *PLoS One* 3:1-3
7. Prince MJ, Bailey JA, Barrowman PR, Bishop KJ, Campbell GR, Wood JM (2003) Bovine spongiform encephalopathy. *Rev Sci Tech OIE* 22:37-60
8. Badiola JJ, Vargas MA, Fernández D (2010) Epidemiología en Badiola JJ, Pumarola M (2010) Encefalopatías espongiformes transmisibles. Ediciones Mayo S.A. 66-88
9. Orge L, Lima C, Machado C, et al (2021) Neuropathology of animal prion diseases. *Biomolecules* 11:1-29
10. Wulf MA, Senatore A, Aguzzi A (2017) The biological function of the cellular prion protein: An update. *BMC Biol* 15:1-13

11. Westergard L, Christensen HM, Harris DA (2007) The cellular prion protein (PrP^c): Its physiological function and role in disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1772:629-644
12. Velayos JL, Irujo A, Cuadrado-Tejedor M, Paternain B, Moleres FJ, Ferrer V (2010) La proteína priónica celular en el sistema nervioso central de mamíferos. *Correlatos anatomoclínicos. Neurología* 24:228-233
13. Collinge J, Clarke A (2007) A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science* 318:930-936
14. Dawson M, Hoinville LJ, Hoise BD, Hunter N (1998) Guidance on the use of PrP genotyping as an aid to the control of clinical scrapie. *Vet Rec* 142:623-625
15. Zhang H, Kaneko K, Nguyen JT, Livshits TL, Baldwin MA, Cohen FE, James TL, Prusiner SB (1995) Conformational transformations in peptides containing two putative α -helices of the prion protein. *J Mol Biol* 250:514-526
16. Naslavsky N, Stein R, Yanai A, Friedlander G, Taraboulos A (1997) Characterization of detergent-insoluble complexes containing the cellular prion protein and its scrapie isoform. *J Biol Chem* 272:6324-6331
17. Prusiner SB (1998) Prions. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13363-13383
18. Baral PK, Yin J, Aguzzi A, James MNG (2019) Transition of the prion protein from a structured cellular form (PrP^c) to the infectious scrapie agent (PrP^{Sc}). *Protein Sci* 28:2055-2063
19. Houston F, Andréoletti O (2019) Animal prion diseases: the risks to human health. *Brain Pathol* 29:248-262
20. Nonno R, Marin-Moreno A, Espinosa JC, et al (2020) Characterization of goat prions demonstrates geographical variation of scrapie strains in Europe and reveals the composite nature of prion strains. *Sci Rep* 10:1-16

21. Benestad SL, Arzac JN, Goldmann W, Nöremark M (2008) Atypical/Nor98 scrapie: properties of the agent, genetics, and epidemiology. *Vet Res.* 39:1-14
22. Huor A, Espinosa JC, Vidal E, Cassard H, Douet JY, Lugan S, et al (2019) The emergence of classical BSE from atypical/Nor98 scrapie. *Proc Natl Acad Sci USA* 116:26853-62.
23. Simmons MM, Konold T, Thurston L, Bellworthy SJ, Chaplin MJ, Moore SJ (2010) The natural atypical scrapie phenotype is preserved on experimental transmission and sub-passage in PRNP homologous sheep. *BMC Vet Res* 6:1-10
24. Marín B, Otero A, Lugan S, Espinosa JC, Marín-Moreno A, Vidal E, et al (2021) Classical BSE prions emerge from asymptomatic pigs challenged with atypical/Nor98 scrapie. *Sci Rep* 11:1-8
25. Detwiler LA, Baylis M (2003) The epidemiology of scrapie. *OIE Rev Sci Tech* 22:121-143
26. Wrathall AE, Brown KFD, Sayers AR, Wells GAH, Simmons MM, Farrelly SSJ, et al (2008) Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology* 70:725-745
27. Miller MW, Williams ES, Hobbs NT, Wolfe LL (2004) Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg Infect Dis* 10:1003-1006
28. Andreatti O, Berthon P, Marc D, Sarradin P, Grosclaude J, Van Keulen L, et al (2000) Early accumulation of PrP(Sc) in gut-associated lymphoid and nervous tissues of susceptible sheep from a Romanov flock with natural scrapie. *J Gen Virol* 81:3115-3126
29. Konold T, Hawkins SAC, Thruston LC, Maddison BC, Gough KC, Duarte A, Simmons HA (2015) Objects in contact with classical scrapie sheep act as a reservoir for scrapie transmission. *Front Vet Sci* 2:1-7

30. Foster JD, Hunter N, Williams A Mylne MJ, McKelvey WA, Hope J, et al (1996) Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec.* 138:559-562
31. Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP (1999) Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol* 80:2307-2318
32. Mohan J, Brown KL, Farquhar CF, Bruce ME, Mabbott NA (2004) Scrapie transmission following exposure through the skin is dependent on follicular dendritic cells in lymphoid tissues. *J Dermatol Sci* 35:101-111
33. van Keulen LJM, Bossers A, van Zijderveld F (2008) TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res* 39:1-12
34. Andreoletti O, Orge L, Benestad SL, et al (2011) Atypical/Nor98 Scrapie Infectivity in Sheep Peripheral Tissues. *PLoS Pathog* 7:1-14
35. Hunter N (1997) PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol* 5:331-334
36. Bossers A, Belt PBGM, Raymond GJ, Caughey B, De Vries R, Smits MA (1997) Scrapie susceptibility-linked polymorphisms modulate the in vitro conversion of sheep prion protein to protease-resistant forms. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:4931-4936
37. Goldmann W (2008) PrP genetics in ruminant transmissible spongiform encephalopathies. *Vet Res* 39:1-14
38. Tranulis MA, Benestad SI, Baron T, Kretzschmar H (2011) Atypical Prion Diseases in Humans and Animals. *Top Curr Chem* 305:23-50
39. Moum T, Olsaker I, Hopp P, Moldal T, Valheim M, Moum T, Benestad SL (2005) Polymorphisms at codons 141 and 154 in the ovine prion protein gene are associated with scrapie Nor98 cases. *J Gen Virol* 86:231-235
40. Konold T, Phelan L (2014) Clinical Examination Protocol to detect Atypical and Classical Scrapie in Sheep. *J Vis Exp* 1-5

41. Animal & Plant Health Agency (2017) Clinical Signs of Transmissible Spongiform Encephalopathies in Sheep. <https://science.vla.gov.uk/tseglobalnet/documents/clinical-signs-tse-sheep-stills.pdf>. Accessed 22 May. 2024
42. Healy AM, Weavers E, McElroy M, Gomez-Parada M, Collins JD, O'Doherty E, Sweeney T, Doherty ML (2003) The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern* 17:908-916
43. Gavier-Widén D, Stack MJ, Baron T, Balachandran A, Simmons M (2005) Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: A review. *J Vet Diagnostic Investig* 17:509-527
44. World Organisation for Animal Health (2018) Scrapie. In: *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals*. 8th ed. World Organisation for Animal Health, Paris, pp 1045-1055
45. Grassi J, Maillet S, Simon S, Morel N (2008) Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res* 39(4):33
46. Moudjou M, Frobert Y, Grassi J, La Bonnardière C (2001) Cellular prion protein status in sheep: Tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol* 82:2017-2024
47. Brandel J-P, Culeux A, Grznarova K, Levavasseur E, Lamy P, Privat N, Welaratne A, Denouel A, Laplanche J-L, Haik S (2019) Amplification techniques and diagnosis of prion diseases. *Rev Neurol (Paris)* 175:458-463
48. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2024) Programa Nacional Plurianual de Vigilancia, Control y Erradicación de la Encefalopatía Espongiforme de los Pequeños Rumiantes (Scrapie) pp 9-70
49. Parlamento Europeo (2022) Reglamento (CE) No 999/2001 del Parlamento y del Consejo de 22 de mayo de 2001 por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles. DOUE 1-122

50. Comisión Europea (2018) Reglamento (UE) 2018/969 de la Comisión de 9 de julio de 2018 por el que se modifica el anexo V del Reglamento (CE) nº 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que concierne a los requisitos de extracción de los materiales especificados de ries. DOUE 12-14
51. Meyne F, Gloeckner SF, Ciesielczyk B, Heinemann U, Krasnianski A, Meissner B, Zerr I (2009) Total prion protein levels in the cerebrospinal fluid are reduced in patients with various neurological disorders. *Alzheimer's Dis* 17:863-873
52. Abu Rumeileh S, Lattanzio F, Stanzani Maserati M, Rizzi R, Capellari S, Parchi P (2017) Diagnostic Accuracy of a Combined Analysis of Cerebrospinal Fluid t-PrP, t-tau, p-tau, and A₄₂ in the Differential Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob Disease from Alzheimer's Disease with Emphasis of Atypical Disease Variants. *Alzheimer's Dis* 55:1471-1480
53. Dorey A, Tholance Y, Vighetto A, Perret-Liaudet A, Lachman I, Krolak-Salmon P, Wagner U, Struyfs H, De Deyn PP, El-Moualij B (2015) Association of cerebrospinal fluid prion protein levels and the distinction between Alzheimer disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *JAMA Neurol* 72:267-275
54. Hilton JK, Cunningham C, Reynolds RA, Perry VH (2013) Early hippocampal synaptic loss precedes neuronal loss and associates with early behavioural deficits in three distinct strains of prion disease. *PLoS ONE* 8(6): e68062
55. Llorens F, Barrio T, Correia Â, Villar-Piqué A, Thüne K, Lange P, Badiola JJ, Schmitz M, Lachmann I, Bolea R (2018) Cerebrospinal fluid prion disease biomarkers in pre-clinical and clinical naturally occurring scrapie. *Mol Neurobiol* 55:8586-8591
56. Kasai T, Tokuda T, Ishii R, Ishigami N, Tsuboi Y, Nakagawa M, Mizuno T, El-Agnaf OM (2014) Increased α -synuclein levels in the cerebrospinal fluid of patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neurol* 261:1203-1209
57. Ness SA (2006) Basic microarray analysis: Strategies for successful experiments. *Methods Mol Biol* 316:13-22

58. Rosenkdranz R, Borodina T, Lehrach H, Himmelbauer H (2008) Characterizing the mouse ES cell transcriptome with Illumina sequencing. *Genomics* 92:187-194
59. Hauzarewich RL, Siemens CG, Booth SA (2010) Application of "omics" to prion biomarker discovery 2010: 613504
60. Kercher L, Favara C, Striebel JF, LaCasse R, Chesebro B (2007) Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and abrain of transgenic mice. *Virology* 357:10340-10351
61. Aguzzi A, Nuvolone M, Zhu C (2013) The immunobiology of prion diseases. *Nat Rev Immunol* 13:888-902
62. Rehli M, Niller HH, Ammon C, Langmann S, Schwarzfischer L, Andreesen R, Krause SW (2003) Transcriptional Regulation of *CHI3L1*, a Marker Gene for Late Stages of Macrophage Differentiation. *J Biol Chem* 278:44058-44067
63. Volck B, Johansen JS, Stoltenberg M, Garbarsch C, Price PA, Østergaard M, Østergaard K, Løvgreen-Nielsen P., Sonne-Holm S., Lorenzen I (2001) Studies on YKL-40 in knee joints of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Involvement of YKL-40 in the joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage* 9:203-214
64. Nishikawa KC, Millis AJT (2003) gp38k (CHI3L1) is a novel adhesion and migration factor for vascular cells. *Exp Cell Res* 287:79-87
65. Villar-Piqué A, Schmitz M, Hermann P, Goebel S, Bunck T, Vargas D, Ferrer I, Riggert J, Llorens F, Zerr I (2019) Plasma YKL-40 in the spectrum of neurodegenerative dementia. *J Neuroinflammation* 16:145
66. Andrés-Benito P, Domínguez R, Colomina MJ, Llorens F, Povedano M, Ferrer I (2018) YKL40 in sporadic amyotrophic lateral sclerosis: cerebrospinal fluid levels as a prognosis marker of disease progression. *AGING* 10(9):2367-2382

67. Carlson CM, Schneider JR, Pedersen JA, Heisey DM, Johnson CJ (2015) Experimental infection of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*) with sheep scrapie. *Can J Vet Res* 79(1):68–73
68. Toledano-Díaz A, Álvarez MI, Rodríguez J-J, Badiola JJ, Monzón M, Toledano A (2021) Reflections on cerebellar neuropathology in classical scrapie. *Biomolecules* 11:649.
69. Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunohistochemical identification of the serine protease inhibitor of plasma α 1-antichymotrypsin levels in Alzheimer disease patients and controls and their genetic controls. *Cell* 52:487-501
70. Wang X, DeKosky ST, Ikonomic MD, Kamboh MI (2002) Distribution of plasma α 1-antichymotrypsin levels in Alzheimer disease patients and controls and their genetic controls. *Neurobiol* 22:377-382
71. Chen C, Xu XXF, Zhang RQ, Ma Y, Lv Y, Li JL, Shi Q, Xiao K, Sun J, Tang XD (2017) Remarkable increases of α 1-antichymotrypsin in brain tissues of rodents during prion infection 11:338-351
72. Miele G, Seeger H, Marino D, Eberhard R, Heikenwalder M, Stoeck K, Basagni M, Knight R, Green A, Chianini F (2008) Urinary α 1-antichymotrypsin: A biomarker of prion infection. *PLoS ONE* 3:e3870
73. Llorens F, Thüne K, Tahir W, Kanata E, Diaz-Lucena D, Xanthopoulos K, Kovatsi E, Pleschka C, García-Esparcia P, Shmitz M (2017) YKL-40 in the brain and cerebrospinal fluid of neurodegenerative dementias. *Mol Neurodegener* 12:83
74. Abraham CR, Selkoe DJ, Potter H (1988) Immunohistochemical identification of the serine protease inhibitor α 1-antichymotrypsin in the brain amyloid deposits of Alzheimer's disease. *Cell* 52: 487–501
75. Matsubara E, Amari M, Shoji M, Harigaya Y, Yamaguchi H, Okamoto K, Hirai S (1989) Serum concentration of α 1-antichymotrypsin is elevated in patients with senile dementia of the Alzheimer type. *Prog Clin Biol Res* 317:707–714.

76. Matsubara E, Hirai S, Amari M, Shoji M, Yamaguchi H, Okamoto K, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K (1990) Alpha 1-antichymo- trypsin as a possible biochemical marker for Alzheimer-type demen- tia. *Ann Neurol* 28:561–567.
77. Licastro F, Masliah E, Pedrini S, Thal LJ (2000) Blood levels of alpha-1- antichymotrypsin and risk factors for Alzheimer’s disease: effects of gender and apolipoprotein E genotype. *Dement Geriatr Cogn Disord* 11:25– 28
78. Licastro F, Morini MC, Polazzi E, Davis LJ (1995) Increased serum alpha 1-antichymotrypsin in patients with probable Alzheimer’s disease: an acute phase reactant without the peripheral acute phase response. *J Neuroimmunol* 57:71–75
79. Teunissen CE, de Vente J, Steinbusch HWM, De Bruijn C (2002) Biochemical markers related to Alzheimer’s dementia in serum and cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging* 23:485:508
80. Betancor M, Pérez-Lázaro S, Otero A, Marín B, Martín-Burriel I, Blennow K (2022) Neurogranin and neurofilament light chain as preclinical biomarkers in scrapie. *Int J Mol Sci* 23(13):7182
81. Reglamento (CE) N° 999/2001, 22 de mayo de 2001, por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas encefalopatías espongiformes transmisibles.
82. Spiropoulos J, Casalinet C, Caramellit M, Simmons MM (2007) Immunohistochemistry of PrPSc in natural scrapie reveals patterns which are associated with the PrP genotype. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 33:398-409