TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
2025
12

Mirta García Martínez

Caracterización de los Receptores tipo Toll en la infección por priones usando como modelo el scrapie ovino

Director/es
Garza García, María Del Carmen
Badiola Díez, Juan José

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

ISSN 2254-7606

Prensas de la Universidad
Universidad Zaragoza

Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Universidad Zaragoza
1542

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN DE LOS RECEPTORES TIPO TOLL EN LA INFECCIÓN POR PRIONES USANDO COMO MODELO EL SCRAPIE OVINO

Autor

Mirta García Martínez

Director/es

Garza García, María Del Carmen
Badiola Díez, Juan José

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Medicina y Sanidad Animal

2023

Repositorio de la Universidad de Zaragoza – Zaguan http://zaguan.unizar.es

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

Tesis Doctoral

Caracterización de los receptores tipo Toll en la infección por priones usando como modelo el scrapie ovino

Memoria de tesis presentada por la graduada

Mirta García Martínez

para optar al grado de Doctora por la Universidad de Zaragoza

Directores:

Dra. María del Carmen Garza García

Dr. Juan José Badiola Díez

Facultad de Veterinaria
Zaragoza, septiembre 2022

LISTA DE ABREBIATURAS

L	Litro	**ºC**	Grado centígrado
ml	Mililitro	**mM**	Milimolar
µl	Microlitro	**nM**	Nanomolar
g	Gramo	**h**	Hora
µg	Microgramo	**min**	Minuto
kDa	KiloDalton		
pb	Pares de bases		

	A
A	Alanina
AD	Alzhéimer
ADN	Ácido desoxirribunucleico
AP-1	Proteína activadora 1
ARN	Ácido ribonucleico
Aβ	Amiloide β
Aβ	Amiloide β
	B
BCA	Ácido biciconínico
BSA	Albúmina se suero bovino
	C
CA 1, 2, 3	Cornus ammonis 1, 2, 3
CD	Células dendrítica
CD14	Grupo de diferenciación 14
CD36	Receptor scavenger clase B
CDF	Células dendríticas folicular
CDp	Célula dendrítica plasmocitoide
CG	Centro germinal
CMH-I/II	Complejo mayor de histocompatibilidad tipo I/tipo II
CPA	Célula presentadora de antígenos
CpG ODN	Oligodesoxinucleótidos con secuencias no metiladas CpG
	D
DAMP	Patrón molecular asociado a peligro
DCL	Demencia con cuerpos de Lewy
	E
ECJe	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica
ECJf	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica familiar
ECJi	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénica
EEB	Encefalopatía espongiforme transmisible
EEC	Encefalopatía caquectizante de los ciervos

EET	Encefalopatía espongiforme transmisible
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimientaria
ELA	Esclerosis lateral amiotrófica
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Esclerosis múltiple
	F
FAE	Epitelio asociado a los folículos
G	
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
GFAP	Proteina acídica fibrilar de la glía
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol
GSS	Enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker
	H
H	Histidina
HE	Hematoxilina-eosina
HMGB1	Proteína del alta movilidad 1
HSP	Proteínas de choque térmico
Hsp (60, 70)	Proteína de choque térmico (60, 70)
HT	Huntington
	I
Iba1	Molécula adaptadora de unión al calcio ionizado
IFE	Insomnio familiar esporádico
IFF	Insomnio familiar fatal
IFN (α, β, γ)	Interferón (alfa, beta, gamma)
IFR	Región interfolicular
IHQ	Inmunohistoquímica
IKK	Quinasa de I kappa B
IL (1, 4, 6,…)	Interleucina (1, 4, 6,…)
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IRAK	Quinasa asociada al receptor de interleucina-1 tipo 4
IRF (3, 7)	Factor de regulación del interferón (3, 7)
	K
K	Lisina
KO	Animal transgénico que no expresa un determinado gen
	L
LPS	Lipopolisacáridos
	M
M1	Macrófago tipo 1 o proinflamatorio
M2	Macrófago tipo 2 o antiinflamatorio
Mfge8	Factor 8 de la proteína globular de la grasa de la leche
miR	micro-ARN
MyD88	Proteina 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide
	N
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B
NK	Célula asesina natural

NO	Óxido nítrico
	O
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
	P
PAMP	Patrón molecular asociado a patógenos
PD	Parkinson
PK	Proteinasa K
PRNP	Gen de la proteína prion
PP	Placa de peyer
$PrP_{106-126}$	Fragmento neurotóxico derivado del prión
PrP^{C}	Proteína prión celular
PrP^{Sc}	Proteína prión patológica
PrPSVP	Prionopatía de sensiblidad varaible a las proteasas
PRR	Receptores de reconocimiento de patrones
	Q
Q	Glutamina
	R
R	Arginina
RANK	Receptor activador del factor nuclear κβ
RANKL	Ligando del receptor activador del factor nuclear κβ
RIP-1	Proteína 1 que reconocer el receptor del factor de necrosis tumoral
	S
SARM	Proteína con dominio armadillo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SED	Cúpula supepitelial
SLM	Stratum lacunosum-moleculare
SLR	Sistema linforeticular
SNC	Sistema nervioso central
SNE	Sistema nervioso entérico
SNP	Sistema nervioso periférico
SSF	Suero salino fisiológico
	T
TAK1	Factor de crecimiento β asociado a la quinasa 1
TBK1	Quinasa de serina/treonina
TBM	Macrófagos de cuerpo tingible
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
Th1/2/17	Linfocitos T colaboradores tipo 1/ tipo 2/ tipo 17
TIR	Receptor Toll/IL-1
TIRAP	Proteína adaptadora con dominio TIR
TLR	Receptor tipo toll
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TRAF3	Factor 3 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAF6	Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral
TRAM	Molécula adaptadora relacionada con TRIF
Treg	Linfocitos T reguladores

TRIF	Inductor de interferón beta con dominio TIR
	U
UE	Unión Europea
	V
V	Valina
vECJ	Variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob
	W
WB	Western blot

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS..... 1

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA..... 8
1. Las encefalopatías espongiformes transmisibles 10
1.1 Descubrimiento de las encefalopatías espongiformes transmisibles..... 12
1.2. La PrP^C y su conversión su isoforma patológica..... 13
1.3. El concepto de cepa y barrera de transmisión..... 15
2. El scrapie clásico 16
2.1. Epidemiología..... 16
2.2. Transmisión, clínica, diganóstico y susceptibilidad/resistencia según el genotipo..... 18
2.3. Patogenia 21
2.4. El intestino delgado: barrera y vía de entrada del agente..... 23
2.4.1. Células involucradas en la captación del prion vía intestinal 24
2.4.1.a. Enterocitos..... 24
2.2.3.b. Células M 25
2.2.3.c. Macrófagos 26
2.2.3.d. Células dendríticas 28
2.2.3.e. Células dendríticas plasmocitoides 30
2.2.3.f. Las células dendríticas foliculares..... 31
2.2.3.g. Linfocitos..... 33
2.2.4. Factores que influyen en la infección vía oral con scrapie 34
2.2.4.a. La edad..... 34
2.2.4.b. El genotipo..... 35
2.2.4.c. La dosis y su administración..... 36
2.3. El sistema nervioso central: respuesta frente al prion..... 36
2.3.2. La neuroinflamación y su asociación con la neurodegeneración. 37
2.3.3. La microglía y su respuesta frente al prion..... 38
2.3.4. La astroglía y su respuesta frente al prion..... 41
3. Los receptores tipo Toll..... 43
3.1. Origen, tipos de receptores tipo Toll y sus ligandos. 44
3.3. Estructura de los receptores tipo Toll y coreceptores..... 45
3.4. Mecanismos de señalización de los receptores tipo Toll..... 47
3.5. Funciones de los receptores tipo Toll. 49
3.6. Mecanismos de regulación de los receptores tipo Toll 50
3.7. Los receptores tipo Toll en las enfermedades neurodegenerativas. 51
3.8. Los receptores tipo Toll en las enfermedades priónicas 56

MATERIAL Y MÉTODOS 60
Material 62
Métodos..... 65
1. Análisis histopatológico e inmunohistoquímico. 65
1.1. Conservación de los tejidos: fijación, tallado, inclusión en parafina y corte en el micrótomo..... 65
1.2. Tinción con hematoxilina-eosina. 65
1.3. Técnicas inmunohistoquímicas. 66
1.3.1. Protocolo para la detección de PrP^{Sc} en muestras ovinas y murinas. 67
1.3.2. Protocolo para la detección de Iba1 y GFAP en el encéfalo de ovejas y ratones. 69
1.3.3. Protocolo para la detección de macrófagos, células dendríticas foliculares, TLR4 y TLR7 en el íleon de ovejas y corderos..... 71

2. Determinación del genotipo ovino para el gen *Prnp.* 72
2.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre. 72
2.2. Amplificación del gen *Prnp* mediante PCR convencional y purificación para su secuenciación. 73
3. Estudios de expresión génica. 74
3.1. Conservación de las muestras. 74
3.2. Extracción de ARN total a partir de muestras de tejido nervioso. 74
3.3. Extracción de ARN total a partir de muestras intestinales. 75
3.4. Determinación de la calidad y concentración del ARN total 76
3.5. Tratamiento con DNasas para la eliminación de ADN genómico. 76
3.6. Síntesis de ADN complementario a partir de ARN total 76
3.7. PCR a tiempo real 77
4. Estudios de expresión proteica 81
4.1. Determinación de la concentración proteica de las muestras 81
4.2. Western blot para la detección de PrP^{Sc} 82
4.3. Western blot para la cuantificación del TLR4 y TLR7 83
4.4 Análisis semicuantitativo de la expresión proteica 84
5. Técnica de diagnóstico rápido para el scrapie clásico 84
6. Bioensayos 85
6.1. Ovejas adultas infectadas de forma natural con scrapie 85
6.2. Bioensayo en ratones tg338: inoculación vía intracerebral 86
6.3. Bioensayo en ratones C57BL/6: inoculación vía intragástrica. 88
6.4. Bioensayo en corderos y ovejas adultas: inoculación vía oral 90
8. Análisis estadístico y representación gráfica 93

RESULTADOS 95
Estudio 1: Análisis de los TLR en el sistema nervioso central de ovejas infectadas con scrapie de forma natural y comparación con el modelo murino 97
1.1. Neuropatología asociada al scrapie. 97
1.2. Hallazgos patológicos en el hipocampo de las ovejas infectadas con scrapie. 103
1.3. Cambios en la expresión génica de los *TLR* y otros genes relacionados con la respuesta inmunitaria e inflamatoria. 108
1.4. Detección de la proteína TLR4 en el SNC. 110
1.5. Características patológicas en el diencéfalo de ratones tg338 infectados vía intracraneal con scrapie. 111
1.6. Cambios en la expresión génica de los *TLR 1-9* y de las citoquinas *TGFß*, *IL10*, *TNFα* e *IL6* en el diencéfalo de ratones tg338. 113
Estudio 2: Análisis de los TLR en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y comparación con el modelo murino 115
2.1. Depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie. 115
2.2. Cambios inmunohistoquímicos en los macrófagos y CDF en el íleon de las ovejas infectadas con scrapie. 118
2.3. Expresión génica de los *TLR* y otros genes asociados en íleon de las ovejas infectadas con scrapie natural 119
2.4. Detección inmunohistoquímica del TLR4 en el íleon de las ovejas con scrapie. 120
2.5. Cambios en la expresión génica en el íleon de ratones C57BL/6 inoculados vía oral con scrapie. 122
2.6. Diferencias histológicas e inmunohistoquímicas en el íleon de los corderos neonatos y ovejas adultas inoculados vía oral con scrapie. 123
2.7. Cambios es la expresión génica y proteica en el íleon de los corderos y las ovejas adultas tras la inoculación vía oral. 130

DISCUSIÓN **136**
1. La implicación de los TLR en la neuropatología de scrapie en infección natural 138
2. La participación del TLR4 en la respuesta a nivel de la barrera intestinal frente al prion en infección natural..... 142
3. La función del TLR7 y 5 en infección experimental con scrapie vía oral en el hospedador natural y en ratones C57BL/6..... 148
3.1. Las células dendríticas y su posible papel en la tolerancia inmunológica frente al prion.151
4. El modelo murino en el estudio de la respuesta inmunitaria de los TLR frente a la infección con scrapie. 152

CONCLUSIONES **156**

RESUMEN **160**

ABSTRACT **164**

ANEXOS **169**

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS **177**

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de la estrucura de la PrP^{C}.....14
Figura 2. Representación geográfica de los casos de scrapie clásico y atípico en ovejas y cabras en la UniónEuropea en el año 2019. 17
Figura 3. Número de casos de scrapie clásico y atrípico por cada 10.000 ovejas o cabras analizadas en rebaños no infectados con encefalopatías espongiformes transmisibles en la Unión Europea durante los años 2010-2019.....18
Figura 4. Rutas de neuroinvasión vía parasimpática y simpática del prion a través del sistema nervioso entérico (SNE).....23
Figura 5. Representación de una célula M en el epitelio asociado al folículo (FAE).....26
Figura 6. Células implicadas en la captación del prion a nivel intestinal y ruta seguida por el prion hasta infectar las células dendríticas foliculares (CDF) para replicarse y diseminarse vía sanguínea y linfática.....28
Figura 7. Métodos de captación de antígenos desarrollados por las células dendríticas.29
Figura 8. Disposición de las células dendríticas foliculares (CDF) en el centro germinal (CG) de un folículo linfoide exponiendo en su superficie la PrP^{Sc}. 33
Figura 9. Representación de los principales tipos de morfología microglial asociada a enfermedades neurodegenerativas.....40
Figura 10. Esquema de la estructura de los TLR 46
Figura 11. Esquema general de las rutas de señalización de los receptores tipo Toll (TLR) 48
Figura 12. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para valorar la espongiosis 66
Figura 13. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para establecer la cantidad de los depósitos de PrP^{Sc}.....68
Figura 14. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para establecer la intensidad de la microgliosis 70
Figura 15. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para establecer la intensidad de la astrogliosis 71
Figura 16. Fotografía tomada durante el procedimiento de inoculación vía intracerebral de los ratones tg338. 87
Figura 17. Esquema de los resultados de Kujala y colaboradores sobre la detección entre las 6 horas postinoculación (hpi) y los 7 días postinoculación (dpi) de la PrP procedente del inóculo mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica en ratones inoculados vía oral. 88
Figura 18. Fotografías tomadas durante el procedimiento de inoculación vía intragástrica de los ratones C57BL/6. 89
Figura 19. Fotografía tomada durante el procedimiento de inoculación vía oral de un cordero a las 48 horas de vida. 92

Figura 20. Representación gráfica del grado de espongiosis, depósitos de PrP^{Sc}, microglioisis y astrogliosis en las 4 regiones del sistema nervioso central (SNC) de las ovejas infectadas con scrapie de forma natural.....97
Figura 21. Imágenes representativas de la espongiosis y los depósitos de PrP^{Sc} en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) y su valoración semicuantitativa (de 0 a 5) en las ovejas control e infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica incipiente y avanzada 98
Figura 22. Tipos de depósitos de PrP^{Sc} y su magnitud evaluada de 0 (ausente) a 3 (severa) en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie. 99
Figura 23. Western blot para la detección de la PrP^{Sc} utilizando como anticuerpo primario SHA31 en la médula oblongada (A), tálamo (B), hipocampo (C) y corteza frontal (D) en las 13 ovejas infectadas de forma natural con scrapie..100
Figura 24. Imágenes representativas de la microgliosis y la astrogliosis en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) y su valoración semicuantitativa (de 0 a 5) en las ovejas control e infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica incipiente y avanzada 102
Figura 25. Imágenes representativas de la neuropatología del hipocampoy la valoración semicuantitativa (de 0 a 5) de la espongiosis, los depósitos de PrP^{Sc}, la microgliosis y la astrogliosis en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y controles en la capa piramidal del cornu amonis (CA) 1, CA3, CA4 y en el stratum lacunosum-moleculare (SLM). 105
Figura 26. Tipos de depósitos de PrP^{Sc} y su magnitud, evaluada de 0 (ausente) a 3 (severa), en el cornu amonis (CA) 1, CA3, CA4 y en el stratum lacunosum-moleculare (SLM) en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie. 106
Figura 27. Microglía en bastón detectada mediante la inmunotinción de la molécula adaptadora de unión al calcio (Iba1).....107
Figura 28. Expresión génica relativa de los TLR 1-10, MyD88, Trif, CD36, CD14 y Tollip en la médula oblongada (A), tálamo (B), hipocampo (C) y corteza frontal (D) de las ovejas infectadas con scrapie en en fase clínica avanzada e incipiente respecto a las ovejas control.....109
Figura 29. Expresión génica relativa de las citoquinas antiinflamatorias (TGFβ e IL10) y proinflamatorias (TN-α e IL6) en el tálamo (A) e hipocampo (B) de las ovejas infectadas en fase clínica incipiente y avanzada con scrapie respecto a las ovejas control 110
Figura 30. Niveles proteicos del TLR4 relativos a la β-actina en la médula oblongada, tálamo, hipocampo y corteza frontal en ovejas infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica avanzada y control.....111
Figura 31. Western blot para la detección de la proteína prion patológica (PrP^{Sc}) de los inóculos administrados vía intracerebral en los ratones tg338 elaborados a partir de la médula oblongada de una oveja sana y una oveja con scrapie. 112

Figura 32. Western blot para la detección de la proteína prion patológica (PrP^{Sc}) utilizando como anticuerpo primario SHA31 en el diencéfalo de ocho ratones tg338 infectados vía intracerebral con scrapie y ocho ratones control. 112
Figura 33. Imágenes representativas de las características neuropatológicas analizadas en el diencéfalo de los ratones tg338 inoculados vía intracerebral con scrapie y control 113
Figura 34. Expresión génica de los TLR 1-7 y 9 (A) y las citoquinas antiinflamatorias (TGFβ e IL10) y proinflamatorias (TNFα e IL6) (B) en el tálamo de los ratones tg338 infectados con scrapie y control 114
Figura 35. Western blot para la detección de PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control utilizando como anticuerpo primario SHA31 (SPI-Bio). 115
Figura 36. Imágenes representativas de la valoración inmunohistoquímica de la PrP^{Sc} utilizando el anticuerpo primario L42 en los folículos linfoides de las placas de peyer en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control. 117
Figura 37. Depósitos de PrP^{Sc} en el sistema nervioso entérico del íleon de las ovejas infectadas con scrapie de forma natural respecto a una oveja control utilizando el anticuerpo primario L42. 117
Figura 38. Imágenes representativas de la valoración inmunohistoquímica de macrófagos utilizando el anticuerpo primario para la detección de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba1) en los folículos linfoides del íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control.. 118
Figura 39. Imágenes representativas de la valoración inmunohistoquímica de las células dendríticas foliculares (CDF) utilizando el anticuerpo primario CNA.42 en los nódulos linfoides del íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control.. 119
Figura 40. Expresión génica relativa de los genes analizados en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica avanzada e incipiente respecto a sus niveles de expresión en ovejas sanas (control)..... 120
Figura 41. Marcaje inmunohistoquímico del TLR4 (NBP2-24538) en los folículos linfoides de las placas de peyer del íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control..... 121
Figura 42. Marcaje inmunohistoquímico del TLR4 (NBP2-24538) en el sistema nervioso entérico de (A) una oveja infectada con scrapie en fase clínica avanzada, (B) en fase clínica incipiente y (C) control. 122
Figura 43. Western blot para la detección de PrP^{Sc} en 100µl de los inóculos administrados vía oral a los ratones C57BL/6 utilizando como anticuerpo primario SHA31.. 122
Figura 44. Expresión génica relativa de los genes TLR1-9, MyD88, IL-10, TNFα y TGFβ, en el íleon de los ratones C57BL/6 inoculados vía oral con un homgeneizado de encéfalo murino positivo a scrapie (scrapie+), un homogeneizado de encéfalo murino negativo a scrapie (scrapie -) y suero salino fisológico (SSF). 123

Figura 45. Western blot para la detección de PrP^{Sc} en 100µl de los inóculos administrados vía oral en los corderos y ovejas adultas utilizando como anticuerpo primario SHA31. 124
Figura 46. Imágenes comparativas del íleon de los corderos y ovejas inoculadas vía oral con scrapie mediante tinción de hematoxilina-eosina.. 125
Figura 47. Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc} utilizando el anticuerpo primario L42 en el íleon de dos corderos y ovejas adultas inoculadas con el homogeneizado positivo a scrapie. 126
Figura 48. Inmunohistoquímica para la detección de macrófagos utilizando el anticuerpo primario anti-Iba1 en los folículos linfoides del íleon de los corderos y las ovejas inoculadas vía oral 128
Figura 49. Inmunohistoquímica para la detección de células dendríticas foliculares (CDF) utilizando el anticuerpo primario CNA.42 en los folículos linfoides del íleon de los corderos inoculados vía oral 129
Figura 50. Representación gráfica de la expresión relativa de los genes TLR1, TLR2, TLR4-9, TGFβ, TNFα, IL-10 y MyD88 en el íleon de los corderos inoculados vía oral a las 48 horas de vida y eutanasiados a las 48 horas postinoculación. 131
Figura 51. Representación gráfica de la expresión relativa de los genes TLR1-8, TLR10, TGFβ, TNFα, IL10 y MyD88 en el íleon de las ovejas inoculadas vía oral y eutanasiadas a las 65 horas postinoculación.. 132
Figura 52. Niveles proteicos del TLR7 relativos a la β-actina en el íleon de los corderos inoculados vía oral con un homogeneizado de encéfalos ovinos positivo a scrapie o negativo y clasificados según su genotipo 133
Figura 53. Detección del TLR7 mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) en el íleon de los cuatro grupos de corderos inoculados vía oral. 134
Figura 54. Esquema de la activación secuencial de la vía dependiente de MyD88 tras la estimulación del TLR4, seguida de la internalización del TLR4 en compartimentos endosomales para activar la vía dependiente de TRIF y finalmente ser degradado en los lisosomas 146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enfermedades priónicas humanas y animales 10
Tabla 2. Clasificación de los genotipos ovinos según su nivel de riesgo frente a la infección con scrapie clásico siendo el nivel 1 el menos susceptible y el nivel 5 el más susceptible.....21
Tabla 3. Principales ligandos de los TLR de origen endógeno y exógeno y su origen. 45
Tabla 4. Cambios en los niveles de expresión génica y proteica de los receptores tipo Toll descritos en las enfermedades neurodegenerativas. 52
Tabla 5. Funciones de los TLR decritas en las enfermedades neurodegenerativas.....54
Tabla 6. Secuencia de los cebadores empleados para la especie ovina, concentracionesa las que se usaron, referencia del gen en la base de datos del NCBI y origen del cebador 79
Tabla 7 Secuencia de los cebadores empleados para la especie murina, concentraciones a las que se usaron, referencia del gen en la base de datos del NCBI y origen del cebador.....80
Tabla 8. Información sobre las ovejas infectadas de forma natural con scrapie utilizadas para el análisis de los receptores tipo Toll en el sistema nervioso central (SNC) e íleon...86
Tabla 9. Diseño experimental para las inoculaciones vía intragástrica de los ratones C57BL/6.....89
Tabla 10. Información sobre los corderos infectados vía oral con scrapie a las 48 horas de vida y eutanasiados a las 48 hora post-inoculación.....91
Tabla 11. Información sobre las ovejas infectadas vía oral con scrapie y eutanasiadas a las 65 horas post-inoculación. 93
Tabla 12. Resultados de la detección de la PrP^{Sc} mediante inmunohistoquímica (IHQ) o western blot (WB) en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie.....101
Tabla 13. Número de nódulos linfáticos totales y recuento de nódulos con depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control.....116
Tabla 14. Número de folículos linfoides medios y SEM en el íleon de los corderos y las oevejas adultas inoculadas vía oral.....124

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Las enfermedades priónicas se caracterizan a nivel del sistema nervioso central (SNC) por una gliosis reactiva, la acumulación de la proteína prion patológica (PrP^{Sc}) y el desarrollo de una degeneración espongiforme. Aunque en un principio se asumió que el sistema inmune no respondía frente a la PrP^{Sc} debido al desarrollo de mecanismos de tolerancia (Porter et al., 1973), hoy en día está ampliamente demostrada la activación de genes vinculados con la respuesta inmunitaria e inflamatoria (Alibhai et al., 2016; Vincenti et al., 2015). Además, estudios recientes de transcriptómica han permitido descubrir que la mayoría de los cambios detectados en la expresión génica durante la neuropatología de las enfermedades priónicas corresponden con alteraciones en las células microgliales y astrogliales y que dichos cambios pueden ser detectados antes incluso de la aparición de los signos clínicos y la degeneración neuronal (Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020; Vincenti et al., 2015). La demostración de esta secuencia temporal supone un hallazgo relevante y demuestra que la activación glial no se desencadena, al menos inicialmente, como respuesta a la muerte neuronal, por lo que podría desencadenarse como respuesta a los depósitos de PrP^{Sc}, a las moléculas asociadas al daño celular liberadas en las fases más tempranas de la enfermedad y/o a las lesiones en las sinápsis neurnales (Baskakov, 2021; Obst et al., 2017; Srivastava et al., 2018). Sin embargo, se ha observado que la sola presencia del prion resulta insuficiente para el desarrollo de las lesiones neurodegenerativas (Alibhai et al., 2016). Consecuentemente, hoy en día todavía no está claro hasta qué punto es la acumulación de PrP^{Sc} el principal factor neurotóxico o es la gliosis reactiva el factor responsable de la neurodegeneración (Benilova et al., 2020; Castilla et al., 2004). Por todo ello, desentrañar las causas de la activación glial y el tipo de respuesta desencadenada es importante para comprender la neuropatología las enfermedades priónicas. Con este propósito y teniendo en cuenta la participación de los receptores tipo Toll (TLR) en la neuropatología de otras enfermedades neurodegenerativas (Heneka et al., 2014), resulta fundamental analizar si los TLR están implicados en la activación de la respuesta glial en las enfermedades priónicas y, en tal caso, estudiar qué moléculas son las responsables de su activación.

Por otro lado, la principal vía de infección con scrapie es la vía oral asociada a la ingestión de material contaminado con el agente (Georgsson et al., 2006). Tras la exposición oral al prion y su captación a nivel digestivo, comienza la primera fase de la linfoinvasión en la que el prion se replica y acumula en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT). Este proceso puede durar meses o años hasta que comienza la invasión del SNC (Andreoletti et al., 2000). La mayor cantidad de tejido linfoide en el íleon respecto a otros tramos intestinales convierte a este segmento del tubo digestivo en el principal punto de multiplicación y depósito del prion, propiciando que sea uno de los tejidos donde antes puede detectarse la PrP^{Sc}. Esta primera fase que transcurre en el intestino delgado y en la que se ven involucradas principalmente células del sistema inmune como células dendríticas (CD), células dendríticas foliculares (CDF), macrófagos y linfocitos, resulta clave para la posterior infección del sistema nervioso entérico (SNE) (Donaldson et al., 2015;

Glaysher & Mabbott, 2007). A pesar de que la detección de la PrP^{Sc} en el GALT asociada a las CDF y los macrófagos de cuerpo tingible (TBM) es un hallazgo común en el scrapie, desde el punto de vista anatomopatológio no se suelen observar lesiones en el tejido linfoide a nivel microscópico, aunque sí a nivel de microscopía electrónica (McGovern & Jeffrey, 2007). No obstante, aunque las alteraciones histopatológicas no sean manifiestas, la acumulación de la PrP^{Sc} en el GALT y en el SNE no pasa desapercibida para el sistema inmune (Da Silva et al., 2017; Khaniya et al., 2009; Maignien et al., 2005). Consecuentemente, habiéndose descrito la implicación de los TLR en multitud de funciones asociadas con la respuesta innata y adaptativa en el intestino (McKernan, 2019), cabe preguntarse si estos receptores participan también en la patogenia del scrapie a nivel intestinal.

Ahora bien, es posible que los TLR también estén implicados en el momento en el que el prion atraviesa la barrera intestinal y es captado por células del sistema inmunitario, como macrófagos (Kujala et al., 2011) y CD (Bradford et al., 2017), para su transporte hasta los tejidos linfoides más próximos. De este modo, aunque los TLR en el intestino están principalmente asociados con el mantenimiento de la homeostasis, la preservación de la barrera intestinal y los mecanismos de tolerancia inmunológica a la necesaria flora intestinal (Allaire et al., 2018; Rakoff-Nahoum et al., 2004), no hay que olvidar que estos receptores también participan en procesos que podrían estar implicados en la captación del prion y su transporte. Así por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación de los TLR con ligandos específicos puede modular la función de absorción de las células M del epitelio asociado a los folículos (FAE) e incrementar el número de CD (Chabot et al., 2006; Chabot et al., 2008) y la emisión de sus prolongaciones hacia la luz intestinal para aumentar su capacidad de captación de antígenos (Chieppa et al., 2006; Rescigno et al., 2001). Por tanto, la existencia una respuesta innata inmediata por los TLR ante la infección vía oral con priones podría tener un efecto sobre las células epiteliales intestinales como las CD subepiteliales favoreciendo o no la captación del agente. Por otro lado, los TLR también están involucrados en la regulación de los mecanismos de tolerancia inmunológica inducidos por las CD sobre los linfocitos T reguladores (Treg), lo que podría ser clave para la inhibición de una respuesta inmune específica en la fase inicial de la infección (Kato et al., 2003; Pasare & Medzhitov, 2003).

Por todo ello, el objetivo principal de esta tesis es investigar el papel que pueden tener los TLR en la respuesta inmune frente al prion a nivel digestivo, tanto en el momento inmediato tras su captación como en estadios más avanzados de la enfermedad, así como en la invasión del SNC, lo que contribuirá al conocimiento de la patogenia de la enfermedad del scrapie.

Para conseguir el objetivo general propuesto se han realizado diversos estudios experimentales, cuyos objetivos específicos son los siguientes:

Estudio 1: Análisis de los TLR en el sistema nervioso central de ovejas infectadas con scrapie de forma natural y comparación con el modelo murino

Objetivo principal:

Estudiar la participación de los TLR en la respuesta neuroinflamatoria de la enfermedad natural de scrapie en la especie ovina y compararla con el modelo murino transgénico infectado experimentalmente con scrapie.

Objetivos específicos:

- Evaluar la degeneración espongiforme, los depósitos de PrP^{Sc} y la respuesta glial en el SNC de ovejas infectadas de forma natural con scrapie.
- Analizar los niveles de expresión génica de los 10 *TLR* ovinos y otros genes relacionados con su estimulación y con sus mecanismos de señalización intracelular en cuatro regiones del SNC: la médula oblongada, tálamo, hipocampo y corteza frontal.
- Relacionar las características neuropatológicas encontradas con los cambios de expresión de los *TLR* hallados en las distintas regiones del SNC.
- Analizar la degeneración espongiforme, los depósitos de PrP^{Sc} y la respuesta microglial y astroglial, así como la expresión génica del los *TLR* en el diencéfalo de ratones tg338 inoculados vía intracerebral con scrapie.

Estudio 2: Análisis de los TLR en el íleon de ovejas infectadas de forma natural y experimental con scrapie y comparación con el modelo murino

Objetivo principal:

Estudiar la participación de los TLR a nivel del íleon en animales infectados con scrapie en la fase más inicial de la infección, es decir, durante la captación a través de la barrera intestinal, como en la fase más avanzada de la enfermedad.

Objetivos específicos:

- Estudiar la distribución y cantidad de depósitos de PrP^{Sc} en el tejido linfoide y el SNE de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y en el íleon de ovejas y corderos a las 65 y 48 horas postinoculación vía oral con scrapie.
- Examinar y comparar la distribución y la proporción de macrófagos y CDF a nivel del íleon de ovejas adultas infectadas de forma natural con scrapie y controles y entre corderos neonatos y ovejas adultas inoculadas vía oral con scrapie y controles para detectar cambios asociados a la infección con scrapie tanto en la fase más inicial de la infección como en la fase clínica de la enfermedad.
- Analizar los niveles de expresión génica de los 10 *TLR* y otros genes relacionados con su estimulación en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie en la fase clínica de la enfermedad y en el íleon de corderos neonatos y ovejas adultas

inoculadas vía oral con scrapie en el momento de la captación del prion a nivel intestinal.

- Comprobar si existen diferencias en la expresión génica de los *TLR* en el momento de la captación del prion a nivel intestinal entre los corderos neonatos y las ovejas adultas, ya que se trata de dos estadios ontogénicos muy distintos respecto al riesgo de infección con scrapie según los datos epidemiológicos y el estatus inmunitario.
- Determinar si la susceptibilidad o resistencia asociada al genotipo para el gen *Prnp* en la especie ovina influye en la expresión génica de los *TLR* en el momento de la captación del prion a nivel intestinal en los corderos neonatos y las ovejas adultas.
- Analizar la expresión génica de los *TLR 1-9* y otros genes relacionados relacionados con su activación en el íleon de ratones C57BL/6 inoculados vía intragástrica con scrapie a las 8 y 20 horas postinoculación, es decir, en el periodo durante el cual el prion debería estar atravesando la barrera intestinal.

-

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. Las encefalopatías espongiformes transmisibles

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas son un conjunto de trastornos neurodegenerativos poco frecuentes, progresivos y letales que afectan a mamíferos. En total, se han descrito dieciocho enfermedades priónicas: nueve en los seres humanos y nueve en animales, siendo los rumiantes el suborden de mamíferos más afectados por estas enfemedades (Tabla 1) (Babelhadj et al., 2018; Gambetti et al., 2008; Imran & Mahmood, 2011; Prusiner, 1998). El término "prion" deriva del acrónimo "proin" (*proteinaceus infectious particle*) y fue acuñado en 1982 por Stanley B. Prusiner para describir a esta partícula de naturaleza exclusivamente proteica desprovista de ácidos nucleicos considerada en la actualidad como el único agente responsable de estas enfermedades (Prusiner, 1982, 1998). El descubrimiento de este agente etiológico inusual, carente de genoma y con capacidad para autoreplicarse, revolucionó el principio biológico de infección y supuso el galardón con el Premio Nobel de Medicina a Stanely S. Prusiner en 1997.

Tabla 1. Enfermedades priónicas humanas y animales (Imran & Mahmood, 2011; Prusiner, 1998)

Enfermedad	Abreviatura	Hospedador natural	Origen	Año de la descripción
Enfermedades priónicas en los animales				
Scrapie clásico	-	Oveja, cabra, muflón	Adquirida	1732
Encefalopatía transmisible del visón	ETV	Visón	Adquirida	1947
Enfermedad crónica caquectizante de los cérvidos	ECC	Ciervo, reno y alce	Adquirida	1967
Encefalopatía espongiforme bovina	EEB	Bovino	Adquirida	1986
Encefalopatía espongiforme felina	EEF	Gato,guepardo, ocelote, puma y tigre	Adquirida	1990 1992
Encefalopatía de ungulados exóticos	EUE	Antílope y bisonte	Adquirida	1986
Encefalopatía espongiforme transmisible de primates no humanos	ETT (PNH)	Lémur	Adquirida	1996
Scrapie atípico	-	Oveja y cabra	Adquirida	1998
Encefalopatía priónica de los camellos	EPC	Dromedarios	Adquirida	2018
Enfermedades priónicas humanas				
Enfermedad de Creutzdfeldt-Jacob esporádica	ECJe	Humano	Esporádica	1920
Enfermedad de Creutzdfeldt-Jacob genética o familiar	ECJf	Humano	Genética	1924
Enfermedad de Gerstmann-Stäussler-Scheinker	GSS	Humano	Genética	1936
Kuru	-	Humano	Adquirida	1953
Enfermedad de Creutzdfeldt-Jacob iatrogenética	ECJi	Humano	Adquirida	1974
Insomnio familiar fatal	IFF	Humano	Genética	1986
Variante de la enfermdad de Creutzdfeldt-Jacob	vECJ	Humano	Adquirida	1996
Insomnio fatal esporádico	IFE	Humano	Esporádica	1999
Prionopatía de sensibilidad variable a las proteasas	PrPSVP	Humano	Esporádica	2008

Las enfermedades priónicas se caracterizan por una degeneración espongiforme, una gliosis reactiva y la pérdida neuronal (Prusiner, 1989), pero la característica más relevante, por considerarse un signo patognomónico, es la acumulación del prion en el SNC y en otros tejidos (Liberski & Ironside, 2004; Prusiner, 1989).

Según su origen las EET pueden clasificarse en adquiridas, genéticas o esporádicas (Prusiner, 1989). Las adquiridas son las causadas por la exposición al agente infeccioso y son las más comunes en los animales. Las de origen genético están asociadas a la herencia de mutaciones en el gen *Prnp,* que codifica la proteína prion, responsables de la generación de una proteína con una conformación anormal. Por último, el origen esporádico es aquel en el que se desconoce la causa ya que no se asocia con ningún factor de riesgo o mutación genética tratándose por tanto de un fenómeno aleatorio.

Entre las EET citadas que afectan a animales destacan por sus consecuencias económicas y/o sanitarias: el scrapie, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) y la enfermedad crónica caquectizante de los cérvidos (ECC), mientras que en la especie humana destaca: la variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ), por su relación con la EEB, y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (ECJe), porque más de la mitad de los casos de enfermedades priónicas son de origen esporádico (Prusiner, 2013).

La enfermedad priónica más estudia y la que está más ampliamente distribuida por todo el mundo es el scrapie. Se describió por primera vez en Europa en el siglo XVIII (en Inglaterra en 1732 y posteriormente en Alemania en 1759) y fue la primera enfermedad priónica en la que se evidenció su carácter infeccioso (Barrairon, 1989). El scrapie es considerado como prototipo de las enfermedades priónicas, razón por la cual fue elegido en esta tesis doctoral para el estudio de la respuesta inmune e inflamatoria en la patogenia de las EET y por ello, más adelante, se desarrolla con detalle esta enfermedad.

Pese a la importancia del scrapie, a raíz de la epidemia de EEB que se inició en los años 80 en Reino Unido, la EEB se convirtió en la enfermedad priónica de mayor impacto social, sanitario y económico por su capacidad para transmitirse a la especie humana mediante el consumo de productos contaminados con los priones responsables de la EEB produciendo la vECJ (Hill et al., 1997). Además, tras la epidemia de EEB, numerosos animales de especies diferentes de rumiantes, primates y felinos desarrollaron nuevas EET tras consumir también piensos elaborados con subproductos de rumiantes infectados con EEB (Kirkwood & Cunningham, 1994; Sigurdson & Miller, 2003). La EEB fue descrita por primera vez en 1986 (Will et al., 1996) y existen varias hipótesis sobre su origen EEB pero la más aceptada es el consumo por parte del ganado bovino de alimentos elaborados con harinas de carne y hueso de origen ovino contaminados con el agente causal del scrapie ovino (Wilesmith et al., 1988).

Otra EET importante que afecta a los rumiantes es la ECC. Esta enfermedad afecta a la familia de los cérvidos y, especialmente, a las especies de ciervos, alces y uapitíes. Fue descubierta por primera vez en 1967 en Colorado y considerada como una EET en 1980 (Williams & Young, 1980). Desde entonces, según el Centro Nacional de Salud de Fauna Silvestre, la ECC se ha extendido por 26 estados de Estados Unidos y 3 provincias canadienses, ha sido detectada en Corea del Sur (Sohn et al., 2002) y recientemente en Europa (Noruega) (Benestad et al., 2016), por lo que se considera una enfermedad emergente en este continente. La ECC es la EET más eficiente desde el punto de vista de la transmisión horizontal por contacto directo entre los animales o por su exposición a un ambiente contaminado, no obstante, también se ha descrito su transmisión vía vertical (Selariu et al., 2015). Por esta razón, la ECC es difícil de controlar, llegando a alcanzar

niveles de prevalencia próximos al 30% en los animales silvestres y de más de un 90% en animales en cautividad (Rivera et al., 2019). Actualmente se desconoce el origen de esta enfermedad aunque se ha especulado que podría haber evolucionado a partir del scrapie ovino o haberse generado de forma espotánea.

Aunque las enfermedades priónicas humanas son poco frecuentes, el ser humano también es hospedador natural de las EET, habiéndose descrito EET de origen esporádico; como la enfermedad de Creutzdfeldt-Jakob esporádica (ECJe), el insomnio fatal esporádico (IFE) y la prionopatía de sensibilidad variable a las proteasa (PrPSVP), de origen genético; entre las que se incluye la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob familiar (ECJf), el Insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), así como de origen adquirido; como el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogenética (ECJi) y la vECJ (Imran & Mahmood, 2011). La ECJe es la enfermedad priónica humana más común, con una incidencia de 1-2 casos por cada millón de habitantes por año (Ladogana et al., 2005). En general, el ECJe aparece en la edad adulta, alrededor de los 67 años, y evoluciona con rapidez causando una demencia progresiva acompañada de síntomas neurológicos como mioclonía, ataxia y problemas visuales, que acaba causando la muerte a los 4-6 meses tras su diagnóstico (Uttley et al., 2020). No obstante, la patología de la ECJe es compleja y comprende varios fenotipos que dependen de los polimorfismos en el gen *PRNP* y del tipo de PrP^{Sc} (Parchi et al., 2009). A pesar de que hay un cierto grado de predisposición genética a padecer ECJe, a día de hoy la causa exacta de esta enfermedad se desconoce (Windl et al., 1996).

1.1 Descubrimiento de las encefalopatías espongiformes transmisibles

En los últimos 70 años, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en desentrañar la compleja naturaleza del agente causal responsable de las EET pero hoy en día su estructura sigue sujeta a debate. Originalmente surgieron varias hipótesis para tratar de explicar la naturaleza del agente causal. Dada su capacidad infecciosa y los largos periodos de incubación que causa, se postuló que podría tratarse de algún tipo de "virus lento" (Barrairon, 1989). También se planteó la teoría del "virinio" por la cual el agente causal podía ser una molécula quimérica, constituida por una proteína codificada por el hospedador y un ácido nucleico no codificante propio del agente infeccioso (Dickinson & Outram, 1988). Así, se postularon hasta un total de quince posibles teorías para tratar de esclarecer su naturaleza (Schneider et al., 2008). Sin embargo, las evidencias en contra de las teorías que proponían la existencia de ácidos nucleicos en su estructura fueron cada vez más numerosas puesto que el agente mostraba una gran resistencia a las altas temperaturas, a la degradación por nucleasas y a la radiación ionizante y ultravioleta a dosis que inactivarían cualquier ácido nucleico descrito hasta la fecha (Alper et al., 1967; Alper et al., 1978; Latarjet et al., 1970; Stamp, 1962). Además, su tamaño era demasiado pequeño para tratarse de una partícula vírica o cualquier otro microorganismo conocido y su resistencia a la formalina no había sido observada en ningún otro tipo de virus (Alper et al., 1966; Pattison, 1965). Estas propiedades tan inusuales llevaron a John Stanley Griffith en 1967 a formular la hipótesis de que el agente responsable del scrapie podía tratarse de una proteína que podría ser capaz de autoreplicarse en el huésped sin necesidad de estar asociada a ácidos nucleicos (Griffith, 1967). Para explicar esta capacidad de autoreplicación Griffith, un matemático sin formación previa en

biología, planteó tres posibles modelos de los cuales el segundo es el que describe la viabilidad termodinámica de un agente proteico para autoreplicarse mediante la propagación de su conformación. Esta teoría tan revolucionaria que presenta a una proteína como posible agente infeccioso fue muy criticada ya que la transmisibilidad de enfermedades asociadas a otros agentes infecciosos como virus, bacterias y hongos, hasta entonces, era producto de la información genética asociada al ADN o ARN, pero por primera vez se postulaba la transmisión de información biológica sin la intervención de ácidos nucleicos.

Años después, Prusiner aporta nuevas pruebas cruciales que apoyan la hipótesis de Griffith de "solo proteína" como agente causal del scrapie. Prusiner demuestra experimentalmente que dicho agente era resistente al tratamiento con nucleasas pero que podía degradarse con enzimas proteolíticas como la proteinasa K (PK) y la tripsina y que podía inactivarse mediante reactivos como el dodecilsulfato sódico (SDS), agentes catrópicos, fenol y urea. También prueba que era estable en detergentes no iónicos y no desnaturalizantes y que presentaba una carga mayoritariamente negativa aunque heterogénea. Esta variabilidad en su carga sugería la presencia de dominios hidrofóbicos en su superficie que podría explicarse por la presencia de cadenas laterales apolares próximas dentro de una proteína (Prusiner et al., 1981). Paralelamente, Bolton y colaboradores logran purificar una proteína con un peso molecular de unos 27-30 kDa, resistente a la digestión con PK, que solo estaba presente en los encéfalos de animales infectados con scrapie, relacionando su presencia con la búsqueda de la ansiada partícula infecciosa y la hipótesis de una proteína como agente etiológico (Bolton et al., 1982). La purificación del péptido PrP^{27-30} permitió la identificación del gen *PRNP* que codificaba la proteína prion celular o PrP^{C}, una proteína muy conservada en los mamíferos y expresada en la mayor parte de los tejidos del organismo, especialmente en el SNC (Oesch et al., 1985). Prácticamente al mismo tiempo, Carlson y colaboradores demuestran que el gen *PRNP* y sus polimorfismos tienen una gran influencia y controlan, al menos en parte, los diferentes periodos de incubación observados en ratones infectados con scrapie (Carlson et al., 1986). Estos avances permitieron la identificación de mutaciones en el gen *PRNP* responsables del desarrollo del de las enfermedades priónicas de carácter genético (Hsiao et al., 1989). Pero la evidencia definitiva de que el gen *PRNP* era fundamental para las enfermedades priónicas llegó al comprobar que ratones que no lo expresaban eran resistentes a la infección (Bueler et al., 1993). Finalmente, Patricia Merz y colaboradores, observaron mediante microscopía electrónica unas estructuras fibrilares procedentes de cerebros infectados con scrapie, ECJ y kuru que posteriormente Prusiner y colaboradores determinaron que estaban compuestas, si no completamente al menos un gran porcentaje, por la proteína prion (Merz et al., 1981; Prusiner et al., 1983). Este hallazgo evidenció finalmente la similitud de este agente infeccioso con otras estructuras de tipo amiloide (Sunde & Blake, 1997).

1.2. La PrP^{C} y su conversión su isoforma patológica

La PrP^{C} es una glicoproteína de unos 230-250 aminoácidos con un peso molecular de 33-35 kDa, dependiendo de la especie, localizada en la membrana celular a la que se ancla a través de su extremo carboxiterminal (C-terminal) mediante un glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Stahl et al., 1992). Su estructura se divide en dos dominios (Figura 1): uno formado por su extremo aminoterminal (N-terminal), que posee una estructura flexible y contiene un octapéptido que

puede repetirse un número variable de veces según la especie (Zahn, 2003), y otro dominio formado por su extremo carboxiterminal (C-terminal), que es globular y consta de tres zonas de hélice α y dos pequeñas láminas β antiparalelas. Ambos dominios están separados por una región central hidrofóbica. El dominio C-terminal cuenta con dos residuos de asparagina que pueden glicosilarse durante el procesamiento post-transduccional y dar lugar a tres glicoformas: la no glicosilada, la monoglicosilada y la diglicosilada. A su vez, los residuos de asparagina están flanqueados por dos residuos de cisteína que forman un puente disulfuro que estabiliza el dominio globular de la proteína (Riek et al., 1996; Zahn et al., 2000). La proporción relativa de cada glicoforma varía según la especie, el tejido o incluso la región del cerebro, lo que influye en factores como la transmisión y la neuropatología de los priones (Beringue et al., 2003).

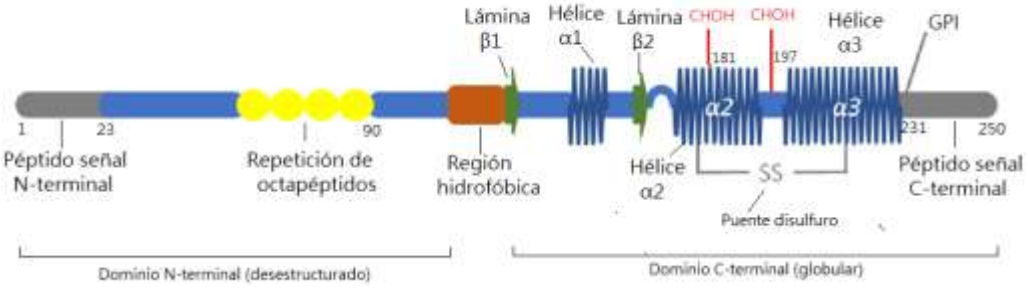


Figura 1. Representación esquemática de la estrucura de la PrP^{C}. Los números indican la posición de los aminoácidos. Las asparaginas que pueden glicosilarse se ubican en la posición 181 y 197. (Imagen modificada de (Gill & Castle, 2018).

La PrP^{C} se expresa desde etapas tempranas de la embriogénesis y está presente de forma constitutiva en prácticamente todos los tejidos del organismo como en el corazón, músculo esquelético, pulmón, intestinos, útero, placenta, células del sistema inmunitario, células madre hematopoyéticas y compartimentos linfoides y mieloides, aunque los mayores niveles se encuentran en el SNC (Horiuchi et al., 1995; Manson et al., 1992; Moudjou et al., 2001; Zhang et al., 2006). Todavía no se conocen con exactitud las funciones fisiológicas que desempeña esta proteína pero se sabe que actúa como receptor para ciertas moléculas de la membrana plasmática, de compatimentos intracelulares y de las vías de secreción tubular, como la laminina (Coitinho et al., 2006) y la ST1 (Coitinho et al., 2007), ambas implicadas en la formación de la memoria. También cumple una función antioxidante regulando la homeostasis del cobre (Brown et al., 1997; D. R. Brown et al., 1999), participa en vías de transducción y señalización intracelular y está implicada en la regulación de la muerte celular, aunque por el momento el mecanismo no está claro (Zomosa-Signoret et al., 2008). Pero, a pesar de sus múltiples funciones, la expresión de esta proteína no es crítica para la supervivencia de los individuos ya que ratones *knock-out* para la PrP^{C} viven prácticamente sanos durante toda su vida (Bueler et al., 1993).

Uno de los fenómenos más importantes en las enfermedades priónicas es la conversión de la PrP^{C} en su isoforma patológica, la PrP^{Sc}, pero lo que ocurre durante esa conversión sostenida y autocatalítica sigue siendo un misterio (Kocisko et al., 1994). En la actualidad hay propuestos dos modelos de conversión priónica para explicar dicho proceso: el modelo de conversión inducida por molde (Cohen & Prusiner, 1998) y el modelo de nucleación-polimerización (Jarrett &

Lansbury, 1993). Básicamente, el primero sugiere que la PrP^{Sc} actúa como molde induciendo el malplegamiento de un estado conformacional intermedio entre la PrP^{C} y la PrP^{Sc} llamado PrP^{*}. Ese nuevo estado surgiría por la unión de la PrP^{C} a un factor no identificado denominado proteína X. El segundo modelo propone la coexistencia de las dos isoformas, la PrP^{C} y la PrP^{Sc}, en un equilibrio termodinámico que podría fluctuar. De este modo, en condiciones normales este equilibrio estaría desplazado hacia la PrP^{C}, pero en condiciones patológicas estaría desplazado hacia la PrP^{Sc}. En este último caso, debido a la inestabilidad de la PrP^{Sc} monomérica, la PrP^{Sc} comenzaría a formar agregados más estables que actuarían como "semilla" reclutando más PrP^{C} e induciendo su conversión. Estos agregados de tipo amiloide se harían cada vez mayores conforme crecieran, se fragmentarían y generarían nuevas semillas. No obstante, aunque el proceso de conversión no esté esclarecido, está demostrado que para que este cambio conformacional tenga lugar, es imprescindible la presencia de la PrP^{C} tanto *in viv*o como *in vitro* ((Bueler et al., 1993; Castilla et al., 2005). También se ha constatado que el cambio conformacional es una característica que la PrP^{Sc} adquiere mediante procesos post-transduccionales (Aguilar-Calvo et al., 2017; Borchelt et al., 1990). Estructuralmente, se ha confirmado que la PrP^{C} y la PrP^{Sc} tienen la misma secuencia aminoacídica, es decir, comparten la misma estructura primaria, pero difieren en su estructura secundaria y terciaria. En la literatura existen más de 13 modelos estructurales propuestos para la estructura de la PrP^{Sc} y actualmente dos son los principales candidatos; un modelo de lámina β intermolecular pararela en registro (Groveman et al., 2014) y un modelo de β-solenoide de cuatro escalones. Sin embargo, ninguno de estos modelos logra stisfacer por completo las exigencias de los datos experimentales (Silva et al., 2015). No obstante, ambos modelos estiman que la PrP^{Sc} está compuesta enteramente por lámina β, una estructura que difiere del 40% de hélice α y el 3% de lámina β que se estima que contiene la PrP^{C} (Pan et al., 1993). Ese cambio conformacional dota a la PrP^{Sc} de las excepcionales propiedades previamente citadas mientras que la mayor proporción de lámina β explica la tendencia a la agregación de la PrP^{Sc} en fibras amiloides, cuya acumulación genera los característicos depósitos en los individuos afectados (Prusiner, 1982).

1.3. El concepto de cepa y barrera de transmisión

Uno de los aspectos más difíciles de explicar en las enfermedades priónicas fue cómo un agente infeccioso de naturaleza proteica podía codificar la información necesaria para inducir diferentes fenotipos de enfermedades priónicas. Múltiples evidencias indican que esos distintos fenotipos se deben a la existencia de diferentes cepas priónicas que, a su vez, podrían estar codificadas por distintas conformaciones de la PrP^{Sc} (Beringue et al., 2008; Jones & Surewicz, 2005). Las cepas priónicas se han definido como aislados infecciosos que al transmitirse a hospedadores singénicos en condiciones experimentales fijas y controladas, exhiben fenotipos distintos de la enfermedad (Aguzzi et al., 2007). Esas condiciones controladas engloban tanto parámetros del agente (cepa, título, tejido y genotipo del donante) como del propio hospedador (genotipo del receptor, ruta de inoculación, edad de infección, género y estado inmunitario). Siendo fijos esos parámetros, las cepas priónicas inducen un fenotipo que puede clasificarse principalmente por su periodo de incubación, los signos clínicos, la distribución e intensidad de la degeneración espongiforme (conocido como perfil de lesional), el patrón de distribución de la PrP^{Sc} y su tropismo tisular tanto en el SNC como fuera de él (Bartz, 2016; Fraser & Bruce, 1973; Fraser &

Dickinson, 1968; Pattison, 1966). La combinación de todas estas características lleva a la definición de una cepa priónica. Pero las cepas priónicas también tienen propiedades bioquímicas diferentes como por ejemplo el tamaño y número de fragmentos resistentes a la proteólisis de la PrP^{Sc} y el patrón de glicosilación (Collinge & Clarke, 2007; Collinge et al., 1996). Sin embargo, todavía no se ha podido determinar la estructura tridimensional de la PrP^{Sc} y tampoco se ha corroborado con total seguridad que sus cambios estructurales sean los responsables de las diferentes cepas priónicas.

El concepto de cepa, a su vez, también está relacionado con el de barrera de transmisión y el de selección conformacional. La barrera de transmisión es un concepto que surge tras observar que ciertas cepas de priones presentan dificultades para transmitirse a una especie diferente de la que proceden, un fenómeno que se manifiesta con tiempos de incubación más largos y/o tasas de ataque menores en comparación con la transmisión intraespecie (Dickinson, 1976). Esto podría deberse a que la propagación del prion es más eficiente cuando la PrP^{Sc} interactúa con una PrP^{C} con estructura primaria idéntica (Collinge, 2001; Palmer et al., 1991), es decir, cuando hay una mayor similitud entre la PrP^{Sc} del donante y la PrP^{C} del receptor ya que la estructura primaria varía entre especies. En determinados casos, la barrera de transmisión puede superarse tras varios pases en la nueva especie hasta que finalmente hay una adaptación del prion a la nueva especie. Esa barrera de transmisión en realidad determinaría qué conformación y por tanto qué cepa es la que mejor se adapta termodinámicamente y, como consecuencia, cuál de ellas dentro de una mezcla de varias cepas presentes en un mismo aislado acaba siendo la seleccionada para propagarse en esa nueva especie.

2. El scrapie clásico

El scrapie, también conocido como tembladera o prúrigo lumbar, es una enfermedad priónica que afecta a las ovejas y a las cabras. El scrapie es la EET más antigua de la que se tiene constancia y dada la complejidad del agente etiológico, resulta lógico que inicialmente se plantearan hipótesis muy dispares sobre las causas de esta enfermedad como por ejemplo miasmáticas, alimenticias, hereditarias, parasitarias o incluso asociadas al cruzamiento por problemas de endogamia o de transmisión sexual (Schneider et al., 2008). Pero el descubrimiento de lesiones a nivel microscópico en el SNC por Besnoit en 1898 y la demostración de su transmisibilidad por Cuillé y Chelle en 1936 y posteriormente por Greig en 1940 (Russell Greig, 1940) sentaron las bases para demostrar el carácter infeccioso del scrapie ((Liberski, 2012). Desde entonces, el scrapie en ovejas y cabras se convirtió en la enfermedad priónica más estudiada considerándose el prototipo de las EET ya que, hasta el desarrollo de modelos murinos, era el mejor modelo para estudiar los mecanismos neuropatológicos de estas enfermedades (Prusiner, 1982).

2.1. Epidemiología

En Europa el scrapie fue descrito por primera vez en Reino Unido a mediados del siglo XVIII, pero se cree que los primeros casos llegaron importados de España por la adquisición de ovejas de raza Merina (Detwiler & Baylis, 2003). Posteriormente, debido principalmente a los movimientos

comerciales, el scrapie se fue diseminando por otros continentes como Asia, África y América. Precismamente en América los primeros casos se detectaron en 1938 en Canadá y en 1947 en Estados Unidos, ambos casos ligados a la importanción de ovejas desde Reino Unido (OIE, 2018; USDA, 2019).

Los datos más actuales sobre el scrapie en en la Unión Europea (UE) fueron publicados por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el año 2020 (EFSA, 2020) en un informe en el que se detallan los datos recogidos a través del programa de vigilancia de las EET en pequeños rumiantes durante el año 2019. Dicho informe muestra que en el año 2019 se analizaron 481.625 pequeños rumiantes en 28 estados miembros, de lo cuales 338.098 (70,2%) fueron ovejas y 143,529 (29,8%) cabras, lo que supone un 3,9% más respecto al año anterior. En total se diagnosticaron 997 casos de scrapie en ovejas, un 6,9% más que en 2018. De esos 977 casos, un 91,4% fueron de scrapie clásico y un 8,6% de scrapie atípico. Estos casos fueron comunicados por 14 estados miembros y su distribución geográfica está representada en la figura 2. Austria, Dinamarca, Suiza y Bulgaria fueron los únicos países que no comunicaron ningún caso de scrapie clásico o atípico en el año 2019. Los resultados del informe reflejan que el scrapie clásico sigue siendo más frecuente que el atípico en la UE en ovejas y cabras alcanzando un ratio de 10,6:1 en ovejas y 34,4:1 en cabras.

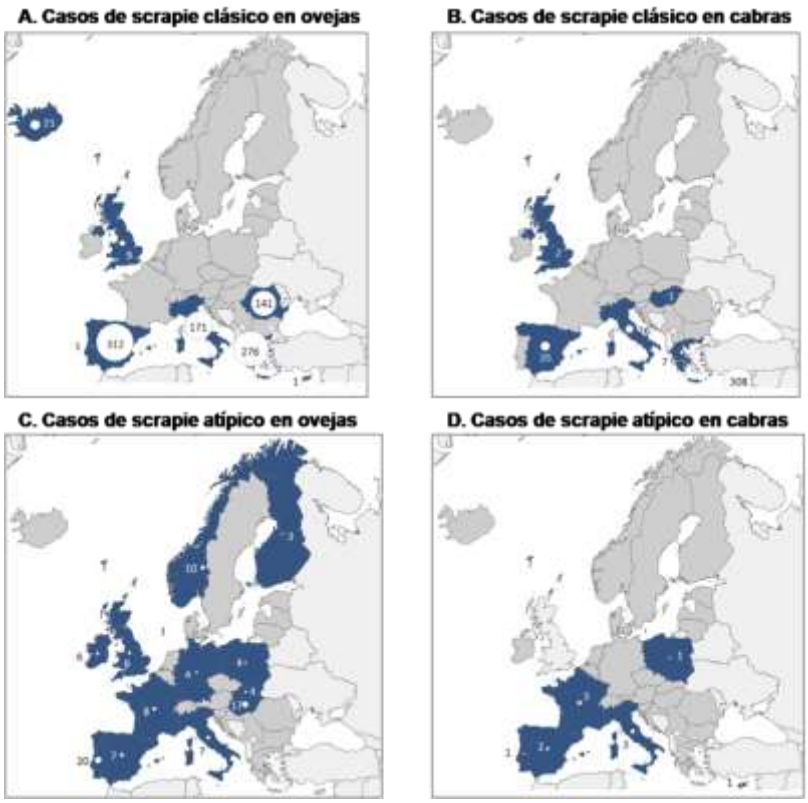


Figura 2. Representación geográfica de los casos de scrapie clásico y atípico en ovejas y cabras en la UniónEuropea en el año 2019 (EFSA, 2020).

Desde el año 2017, el número de casos totales de scrapie clásico ha aumentado, siendo de 839 en 2017, 820 en 2018 y 911 en 2019. Este repunte se debe principalmente al incremento en el número de test realizados dentro de los rebaños infectados con scrapie, lo que ha supuesto un aumento del número de casos notificados. Por este motivo, Grecia, Italia y España han notificado,

respectivamente, un 55%, 12% y 14% más de casos en el año 2019 respecto al año 2018. No obstante, la evolución en el número de casos de scrapie en ovejas y cabras por cada 10.000 animales analizados durante los años 2010-2019 en la UE muestra una tendencia decreciente en el caso de las ovejas, tanto para el scrapie clásico como atípico, y una tendencia más o menos estable en las cabras (Figura 3).

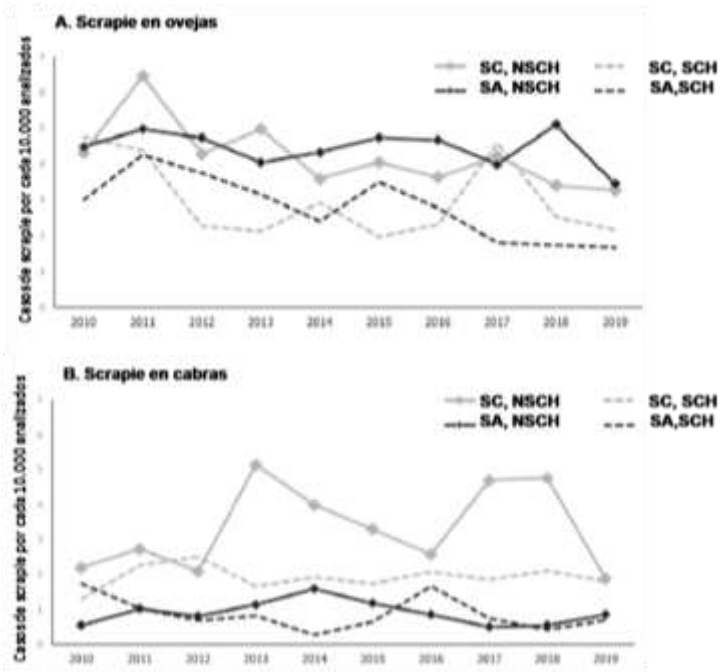


Figura 3. Número de casos de scrapie clásico y atrípico por cada 10.000 ovejas o cabras analizadas en rebaños no infectados con encefalopatías espongiformes transmisibles en la Unión Europea durante los años 2010-2019. SC: scrapie clásico, SA: scrapie atípico, NSCH: no sacrificado para consumo humano, SCH: sarificado para consumo humano.

A nivel global, actualmente la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) estima que el scrapie tiene una distribución prácticamente mundial y lo considera endémico en numerosas partes del mundo pero, debido a la ausencia de programas de vigilancia activa, se desconoce el veradero estatus de muchos países (OIE, 2018). Para que un país miembro de la OIE sea calificado como libre de la enfermedad de scrapie debe cumplir una serie de condiciones bastante estrictas y laboriosas (OIE, 2021), como presentar un informe detallado sobre las medidas implantadas para reducir el riesgo de entrada del scrapie en su territorio durante los siete últimos años, disponer de un programa de vigilancia estricto, prohibir la alimentación de ovejas y cabras con harinas de carne y hueso de origen rumiante y demostrar la vigencia de esta norma durante al menos los siete años previos. Conseguir dicho estatus resulta tan complejo que por el momento solo Australia y Nueva Zelanda son considerados libres de esta enfermedad (OIE, 2018).

2.2. Transmisión, clínica, diganóstico y susceptibilidad/resistencia según el genotipo.

El scrapie puede transmitirse de forma horizontal, generalmente por la exposición a un ambiente contaminado, o de forma vertical *in utero*. La tansmisión horizontal es considerada la vía natural y más común de transmisión del scrapie ovino debido a que el prion, al ser un agente altamente

resistente, contamina y persiste durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente (Georgsson et al., 2006). Las principales fuentes de contaminación ambiental son las placentas, ya que pueden albergar grandes cantidades de PrP^{Sc}, pero también las excreciones/secreciones como heces, orina, leche o saliva y los cadáveres de animales infectados (Andreoletti et al., 2002; Gough et al., 2015; Safar et al., 2008). De este modo, un animal puede infectarse al entrar en contacto con el agente a través de heridas, mucosas como la conjuntiva o, la más probable y demostrada, por la exposición vía oral. De hecho, la vía oral de infección ha sido estudiada tanto en casos de infección natural como experimental y se ha comprobado que en ambas situaciones sigue un patrón similar (Heggebo et al., 2000). Respecto a la transmisión vertical, aunque ha sido demostrada por algunos autores (Foster et al., 2013; Garza et al., 2011), se cree que en la mayoría de los casos los corderos se infectan en el momento del parto o justo después a partir de la placenta o por la presencia del prion en la leche y el calostro (Konold et al., 2013; Lacroux et al., 2008).

La sintomatología del scrapie clásico se detecta generalmente en ovejas de entre dos y cinco años de edad que, tras la aparición de los signos clínicos, sobreviven de uno a seis meses (Aguzzi et al., 2007; Dickinson et al., 1965). Los primeros signos clínicos que manifiestan las ovejas suelen ser cambios en su comportamiento y en su estado mental, mostrándose más nerviosas y/o perdiendo su instinto gregario. Estos cambios son tan sutiles que normalmente pasan desapercibidos. Progresivamente la clínica avanza, su condición corporal disminuye, los reflejos en sus extremidades fallan, aparecen los primeros signos de ataxia y comienzan a desarrollar bruxismo y prurito en la zona lumbar, en el tórax y en la cara interna y externa de las extremidades. Como consecuencia del prurito, los animales se rascan y se frotan con objetos (vallas, comedero, pared…) causando la pérdida de la lana y la aparición de zonas alopécicas. Finalmente, en la fase clínica más avanzada, las ovejas muestran contracciones mioclónicas, temblores de cabeza, ataxia severa, hasta que son incapaces de levantarse y mueren (Vargas et al., 2006).

El diagnóstico *ante-mortem* del scrapie puede llevarse a cabo mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) detectando la PrP^{Sc} en muestras de tejido linfoide tomadas mediante biopsias de amígdalas palatinas, membrana nictitante o mucosa rectal (Espenes et al., 2006; O'Rourke et al., 2000; Schreuder et al., 1998). Sin embargo, la sensibilidad de este método diagnóstico no es muy alta porque la presencia del prion en el tejido linfoide es variable (Monleon et al., 2011). Por tanto, la confirmación del diagnóstico debe realizarse *post*-mortem tomando una muestra de la médula oblongada a nivel del obex, ya que suele ser el primer lugar del SNC donde se detecta el prion (Wood et al., 1997). Aunque el examen histopatológico del obex y otras áreas del SNC permite detectar la presencia de vacuolas mediante técnicas de laboratorio básicas, como la tinción de hematoxilina-eosina (Begara-McGorum et al., 2002; Ligios et al., 2002), el diagnóstico oficial y definitivo requiere siempre la detección específica de la PrP^{Sc} (OIE, 2018). Para ello, actualmente la OIE establece que el diagnóstico del scrapie clásico puede llevarse a cabo mediante técnicas rápidas usando ciertos test comerciales de Western blot (WB) o ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y si el resultado es positivo o no concluyente debe confirmarse por IHQ (OIE, 2018). No obstante, estas técnicas de diagnóstico aportan mucha más información. Así, el estudio histopatológico permite conocer la distribución y la intensidad de las lesiones espongiformes a nivel del SNC para determinar el perfil lesional (Gonzalez et al., 2002),

un parámetro que resulta especialmente útil para la caracterización de las cepas priónicas en la especie murina (Fraser & Dickinson, 1968, 1973). La IHQ también proporciona información semicuantitativa sobre los depósitos de PrP^{Sc}, contribuye a la diferenciación entre cepas (Gonzalez et al., 2003; Jeffrey et al., 2003; Jeffrey, Martin, Gonzalez, et al., 2001; Lezmi et al., 2011) y permite la caracterización de los tipos de depósitos de PrP^{Sc} (Gonzalez et al., 2002; Heggebo et al., 2002). El WB permite un análisis semicuantitativo de la cantidad de PrP^{Sc} al comparar muestras con una misma concentración proteica y aporta información sobre el patrón de glicosilación, es decir, la proporción relativa de las tres glicoformas de la proteína, que a su vez también posibilita la diferenciación de cepas (Gough et al., 2015). Por último, el ELISA también puede aportar información semicuantitativa de la cantidad de PrP^{Sc} si se realiza una curva de diluciones de una muestra conocida (Garza et al., 2014).

La susceptibilidad al scrapie clásico en la especie ovina está determinada principalmente por factores genéticos. Los factores genéticos están claramente ligados a los polimorfismos del gen *PRNP* cuyos cambios aminoacídicos determinan la estabilidad conformacional de la proteína PrP (Diaz et al., 2005; Goldmann et al., 1994; Houston et al., 2015). Los más importantes detectados en esta especie son los localizados en el codón 136 (A: alanina o V: valina), 154 (R: arginina o H: histidina), y 171 (R, Q: glutamina o H: histidina) (Goldmann et al., 1991; Goldmann et al., 1990). En el codón 171 se ha descrito un tercer polimorfismo, lisina (K), pero su frecuencia es escasa en los rebaños y se cree que tiene un efecto similar a la glutamina (Greenlee et al., 2012). También se han descubierto otros polimorfismos menos importantes que incrementan la resistencia en el codón 112, en el que la metionina (M) es sustituida por treonina (T), y en el codón 141, en el que la leucina (L) puede ser sustituida por fenilalanina (F) (Goldmann et al., 2005; Gonzalez et al., 2012; Zhang et al., 2004).

Los polimorfismos en los codones 136, 154 y 171 dan lugar a cinco haplotipos (ARQ, VRQ, AHQ, ARR y ARH) cuya combinación genera quince posibles genotipos. Mediante análisis epidemiológicos, dichos genotipos han podido relacionarse con la proporción de ovejas que en condiciones naturales se infectan con scrapie y se han ordenado en cinco grupos según la mayor susceptibilidad (grupo 5) o resistencia (grupo 1) a la infección (Tabla 2) (Diaz et al., 2005; Elsen et al., 1999). Sin embargo, se estima que los polimorfismos del gen *PRNP* son responsables de solo un 21% de los factores genéticos asociados a la susceptibilidad, por tanto, otros genes también influyen en la patogenia del scrapie (Diaz et al., 2005; Moreno et al., 2008; Moreno et al., 2003). Por otro lado, la secuencia primaria de la proteína PrP^{C} no es el único determinante en su mecanismo de conversión en la isoforma patológica ya que la estructura de la PrP^{Sc} es mucho más compleja y otros factores, como por ejemplo modificaciones post-transduccionales, alteran su patrón de glicosilación variando su capacidad para replicarse, su neurotropismo y su neurotoxicidad (Baskakov et al., 2018; Myers et al., 2020).

Tabla 2. Clasificación de los genotipos ovinos según su nivel de riesgo frente a la infección con scrapie clásico siendo el nivel 1 el menos susceptible y el nivel 5 el más susceptible.

Grupo de riesgo	Descripción	Genotipos
R1	Animales genéticamente muy resistentes al scrapie con muy bajo riesgo para su progenie.	ARR/ARR
R2	Animales genéticamente resistentes al scrapie y con bajo riesgo para su progenie	ARR/ARQ, ARR/ARH, ARR/AHQ
R3	Animales con poca resistencia genética al scrapie. El resigo para su progenie depende del otro progenitor.	ARQ/ARQ, ARQ/ARH, ARQ/AHQ, AHQ/AHQ, ARH/ARH, AHQ/ARH
R4	Animales genéticamente susceptibles al scrapie con riesgo para su progenie.	ARR/VRQ
R5	Animales con alto riesgo individual al scrapie y con alto riesgo para su progenie.	ARQ/VRQ, ARH/VRQ, AHQ/VRQ, VRQ/VRQ

Establecer la conexión entre el genotipo para el gen *PRNP* y la susceptibilidad al scrapie supuso un avance importante para el diseño de los planes de control y erradicación del scrapie clásico basados en la selección de los genotipos resistentes en la UE y en Estados Unidos (Acin et al., 2021). Este cribado genético es de gran importancia porque, como se observa en el informe de la EFSA de 2020, el 98,7% de los casos de scrapie clásico notificados en 2019 en la UE están ligados a los genotipos susceptibles contempleados en los grupos de riesgo 3, 4 y 5. Sin embargo, el cribado genético basado en la selección de animales reproductores con genotipos ARR/ARR no siempre es posible porque su frecuencia en ciertos rebaños o razas no es común. Por otro lado, esta selección genética supone un hándicap para la erradicación del scrapie atípico ya que el haplotipo ARR, que confiere resistencia frente al scrapie clásico, no protege frente al scrapie atípico (Saunders et al., 2006). Este hecho resulta evidente al comprobar que en el año 2019 casi el 55% de los casos de scrapie atípico detectados en la UE fueron diagnosticados en los grupos de riesgo R1 y 2 (EFSA, 2020). Consecuentemente, los programas de control y erradicación deben diseñarse y actualizarse periódicamente en función de su prevalencia, de ahí la importancia de los programas de vigilacia implantados en la UE y otros países. Por este motivo, la investigación científica sigue siendo fundamental para la erradicación del scrapie y continúa planteando teorías tan relevantes como su posible potencial zoonotico. Así, a raíz de la publicación de un estudio que demostró que el scrapie podía propagarse en modelos murinos transgénicos que expresan la PrP^C humana, generando en un segundo pase un patrón similar al ECJe (Cassard et al., 2014), la EFSA tuvo que reevaluar el riesgo que suponía esta enfermedad para el consumo humano. No obstante, la EFSA concluyó que no había pruebas suficientes que demostrasen que en condiciones naturales el scrapie pudiera ser zoonótico, aunque señaló la necesidad de realizar en el futuro más estudios para evaluar el riesgo real que puede suponer el el scrapie clásico para la salud pública.

2.3. Patogenia

En el scrapie clásico, como se ha comentado anteriormente, la vía oral asociada a la ingestión de material contaminado con el agente es considera la vía de infección natural más probable (Detwiler & Baylis, 2003). Tras su ingestión, el prion alcanza el SNC mediante un proceso denominado neuroinvasión. El estudio de la secuencia de diseminación del prion por el organismo en modelos experimentales ha permitido conocer la existencia de dos rutas principales de neuroinvasión a través del sistema nervioso autónomo: una vía directa, en la que el prion

accede, aunque de un modo todavía desconocido, al sistema nervioso periférico (SNP) sin previa replicación en el tejido linfoide (Ligios et al., 2006; Race et al., 2000), y otra que implica la participación del sistema linforeticular (SLR) previa a la infección del SNP (Beekes & McBride, 2000; Jeffrey, Ryder, et al., 2001; McBride et al., 2001). Esta última vía de neuroinvasión es la más común en la infección vía oral con scrapie clásico y se divide en tres fases que se solapan parcialmente (Siso et al., 2010; van Keulen et al., 2002). En la primera fase, el prion es captado en el intestino e infecta el GALT y los principales linfonodos encargados su drenaje. Como consecuencia, los primeros depósitos de PrP^{Sc} que se detectan aparecen en las tonsilas, las placas de peyer (PP) ileales y yeyunales y los linfonodos retrofaríngeos y mesentéricos (Andreoletti et al., 2000; Ersdal et al., 2005; van Keulen et al., 2002). En la segunda fase, el prion se disemina vía linfática y sanguínea hacia otros tejidos y órganos linfoides como el bazo. Estas dos primeras fases de linfoinvasión suelen coincidir con la fase preclínica del scrapie. Por último, en la tercera fase, el prion alcanza el SNP y comienza su ruta en dirección retrógrada hacia el SNC, el encéfalo y la médula espinal.

La magnitud y la duración de la participación del SLR es una de las características que diferencia a las enfermedades priónicas y depende de varios factores como la cepa priónica, la especie y el genotipo del hospedador (Jeffrey & Gonzalez, 2007; van Keulen et al., 2008). Así, en el caso del scrapie clásico y la ECC (Sigurdson et al., 1999), la linfoinvasión es común antes de la fase de neuroinvasión pero, a diferencia de las anteriores, en el scrapie atípico no se ha logrado detectar mediante técnicas diagnósticas la PrP^{Sc} en el tejidos periféricos o linfoides, aunque sí se ha demostrado su infectividad mediante bioensayos (Andreoletti et al., 2011; Benestad et al., 2003). Asimismo, en otras EET como en la EEB bovina, la implicación del tejido linfoide también es mínima, habiéndose detectado la PrP^{Sc} en la tonsila palatina (Wells et al., 2005) y en el íleon distal (Wells et al., 1998). No obstante, cuando el agente de la EEB infecta a otras especies como el ovino (Foster, Parnham, Hunter, et al., 2001) y el humano (Ramasamy et al., 2003), el SLR se encuentra involucrado mostrando altos niveles de infectividad de forma semejante a lo que sucede en el scrapie ovino.

En los casos en los que el prion se propaga de forma eficiente por el SLR, al ser el GALT un tejido muy inervado, es relativamente fácil que el prion establezca ahí el primer contacto con las fibras nerviosas del SNE (Defaweux et al., 2005; Felten et al., 1985). Por ello, tanto en los casos naturales de scrapie, como en las infecciones experimentales vía oral, los primeros lugares del SNE donde se pueden detectar depósitos de PrP^{Sc} son a nivel del íleon y duodeno (Heggebo et al., 2002; van Keulen et al., 2000). Una vez el prion alcanza el SNE, viaja por las vías eferentes parasimpáticas (nervio vago) o simpáticas (nervio esplácnico) hasta la médula oblongada o la médula espinal, respectivamente (Figura 4). De este modo, a través de la vía parasimpática, el prion asciende hasta la médula oblongada y comienza a depositarse en el núcleo dorsal del nervio vago, que contiene los núcleos neuronales de las neuronas parasimpáticas que inervan las vísceras (Andreoletti et al., 2000; Ersdal et al., 2003; Heggebo et al., 2000; van Keulen et al., 2002). Mediante la vía simpática, el prion avanza vía retrógrada, pasando por los ganglios mesentéricos y continúa hasta el asta intermediolateral del segmento torácico T8-T10 de la médula espinal (van Keulen et al., 2000). Alcanzados ambos puntos, el prion continúa ascendiendo por la médula espinal torácica y cervical mientras se propaga por el cerebro en dirección rostral (McBride et al., 2001; van Keulen et al.,

2000; Wemheuer et al., 2011). Al mismo tiempo comienza su diseminación vía anterógrada a través de las fibras nerviosas (Kimberlin et al., 1983; van Keulen et al., 2002)

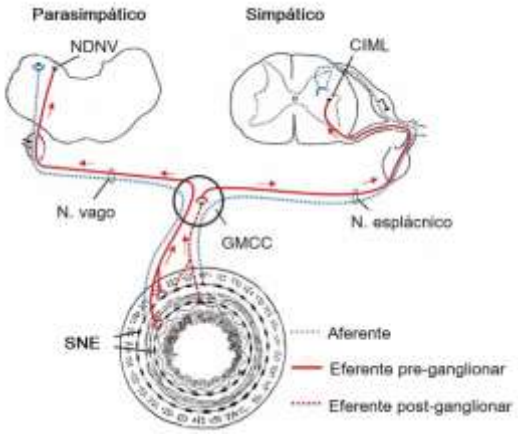


Figura 4. Rutas de neuroinvasión vía parasimpática y simpática del prion a través del sistema nervioso entérico (SNE). Los cuerpos neuronales preganglionares de la vía eferente del nervio vago se localizan en el núcleo dorsal del nervio vago (NDNV) de la médula oblongada, mientras que los cuerpos neuronales preganglionares de la vía eferente simpática se localizan en el asta intermediolateral de la médula espinal y hacen sinápsis en los ganglios mesentéricos con las neuronas postganglionares (van Keulen et al., 2002).

Aunque la vía de neuroinvasión descrita a través del sistema nervioso autónomo es considerada como la principal en el caso de la infección vía oral, no se puede descartar la participación de otras posibles rutas de neuroinvasión como la vía hematógena. En este sentido, varios estudios han demostrado la infectividad de la sangre de ovejas en fase clínica y preclínica al transmitir el agente causal del scrapie y la EEB mediante la transfusión de sangre ovina (Houston et al., 2008; Hunter et al., 2002). Además, se ha descrito la acumulación del prion en los órganos circunventriculares de ovejas en fase preclínica, unas estructuras localizadas en las paredes del tercer y cuarto ventrículo caracterizadas por carecer de barrera hematoencefálica, lo que sugiere que podrían actuar como puertas de entrada al SNC para el prion (Siso et al., 2009).

En cualquier caso, para que la infección vía oral prospere, ya sea con replicación en SLR o no, el prion tiene que atravesar la barrera intestinal. Esta captación del prion a nivel intestinal ha sido objeto de numerosos estudios pero todavía existen importantes incógnitas y desacuerdos sobre qué células son las responsables del transporte del prion desde la luz intestinal hacia las capas más profundas del sistema digestivo y sobre si se desecadena a nivel local algún tipo de respuesta inmunitaria por parte de estos tipos celulares. Por ello, a continuación se profundiza en los componentes de la barrera intestinal y su posible implicación en la captación del prion a nivel intestinal.

2.4. El intestino delgado: barrera y vía de entrada del agente

Las principales funciones del intestino son la digestión y la absorción de nutrientes y agua, pero también actúa como barrera entre el medio externo y el medio interno impidiendo el paso de sustancias o microorganismos nocivos. La barrera intestinal supone, de un modo todavía incierto, un mecanismo de protección frente a la infección por priones vía oral ya que se ha observado por ejemplo que para infectar ratones con scrapie se requieren dosis de inóculo mayores vía oral que

intraperitoneal (Maignien et al., 1999; Prinz, Huber, et al., 2003). De forma similar, en la especie ovina la mínima dosis infectiva con EEB vía oral es cien veces superior a la necesaria vía intracraneal (McGovern et al., 2016). Una de las causas de esta diferencia en las dosis infectivas según la vía de inoculación es que el prion al pasar por el sistema digestivo se degrada parcialmente. De hecho, se ha demostrado que la incubación de los inóculos de scrapie con fluídos del tracto digestivo disminuye su positividad por WB (Jeffrey et al., 2006). Asimismo, la administración de omeprazol en ratones para aumentar el pH gástrico causa una mayor tasa de infección al reducir la eficiencia de los jugos gástricos (Martinsen et al., 2011). Otra de las causas que hace que la vía oral sea menos eficaz que otras vías es que no todo el agente que entra o se administra vía oral es captado, ya que parte de él simplemente atraviesa el sistema digestivo y se excreta. No obstante, aunque las evidencias demuestran que la vía oral como ruta de entrada dificulta la infección, indudablemente en algunos casos el prion es capaz de atravesar la barrera intestinal y escapar de cualquier respuesta inmunitaria que pueda desencadenarse frente a él como agente invasor.

Puesto que el intestino delgado, y en particular el íleon, es el tramo del sistema digestivo donde primero se acumula y detecta la PrP^{Sc} en el scrapie natural (Andreoletti et al., 2000), a continuación se desarrollan las posibes interacciones del prion con los componentes de la barrera intestinal.

2.4.1. Células involucradas en la captación del prion vía intestinal

Como se ha descrito anteriormente, numerosos estudios han permitido trazar y comprender en gran medida la ruta que sigue el prion, desde que entra en la cavidad oral, hasta que atraviesa la barrera intestinal y accede al SLR y SNE donde comienza a replicarse y a acumularse. Sin embargo, no hay un consenso claro sobre qué estructuras o células son decisivas en el transporte del agente a través de la barrera intestinal. Probablemente, muchas de estas dudas y contradicciones son el resultado de que no hay una única célula responsable de la capación del prion y, como consecuencia, dependiendo de factores como la dosis, la edad, la especie, o la cepa, la captación del prion varía (Ano et al., 2009). A continuación, se detallan los estudios relativos a la captación y transporte del prion por cada uno de los tipos celulares constituyentes de la barrera intestinal.

2.4.1.a. Enterocitos

Los enterocitos, como todas las células del epitelio intestinal, surgen de células madre localizadas en el fondo de las criptas de Lieberkühn. Conforme maduran, van ascendiendo por las vellosidades intestinales hasta llegar a su extremo para acabar siendo reemplazados por otros enterocitos en un ciclo vital que dura de 2 a 5 días (Umar, 2010). Son las células más abundantes del epitelio intestinal y se localizan tanto en las vellosidades intestinales como en el FAE. Además de participar en los procesos de digestión y en la absorción de nutrientes, cumplen funciones defensivas ya que forman una barrera física al unirse entre sí por el borde apical mediante zónulas adherens y captan antígenos de la luz intestinal para desencadenar la respuesta inmune (Snoeck et al., 2005). Aunque los enterocitos localizados en el epitelio de las vellosidades y en el FAE son indistinguibles morfológicamente, funcionalmente son diferentes. Los enterocitos del FAE tienen menos hidrolasas en su borde en cepillo y no participan en la absorción de nutrientes ni producen

inmunoglobulina A (Pappo & Owen, 1988; Smith, 1985). Además, producen quimiocinas que atraen a las CD hacia la cúpula subepitelial (SED) para facilitar la captación de los antígenos transportados por las células M (Zhao et al., 2003).

Los enterocitos juegan un papel importante en la captación del prion vía intestinal. Estudios realizados *in vitro* con células epiteliales intestinales de origen bovino y humano demuestran que son capaces de captar el prion y transportarlo a través de su citoplasma mediante vesículas endosomales, desde su lado apical, hasta su membrana basolateral (Mishra et al., 2004; Morel et al., 2005). Este proceso de transcitosis también se ha observado en ratones inoculados vía oral con scrapie en los que se ha colocalizado el prion con marcadores endosomales en el interior de enterocitos del FAE a las 24 horas postinoculación vía oral (Kujala et al., 2011).

Actualmente no se conoce con certeza el o los receptores encargados de la captación del prion a nivel intestinal, pero el receptor de laminina es un buen candidato ya que su bloqueo disminuye significativamente la captación del prion (Mishra et al., 2004; Vana et al., 2009). Lo que sí parece bastante probado es que la expresión de la proteína PrP^c no afecta la captación del prion por parte de este tipo celular dado que su inhibición, tanto *in vitro* como en ratones, no impide que los enterocitos capten y transporten el prion (Kujala et al., 2011; Marshall et al., 2018). De igual modo, la sobrexpresión de la PrP^c en los enterocitos tampoco favorece la absorción del prion (Mishra et al., 2004). Consecuentemente, estos resultados sugieren que el genotipo no influye en las primeras fases de infección, apoyando el estudio de Jeffrey y colaboradores en el que no se observaron diferencias en la captación del inóculo vía intestinal entre corderos con genotipo susceptible o resistente al scrapie (Jeffrey et al., 2006).

2.2.3.b. Células M

Las células M son células epiteliales especializadas en la captación de macromoléculas, antígenos, y microorganismos de la luz intestinal para transportarlos vía transepitelial desde su lado apical hasta su membrana basolateral. En condiciones normales constituyen alrededor de un 10% de las células del FAE pero también se han descrito células M en otras zonas del epitelio intestinal, aunque se desconoce si son funcionalmente equivalentes a las del FAE (Jang et al., 2004; Mabbott et al., 2013).

Originariamente las células M derivan de enterocitos cuyo receptor activador del factor nuclear κβ (RANK) es estimulado por su ligando (RANKL) liberado por células del estroma localizadas debajo del FAE (Knoop et al., 2009). Paralelamente existen otros mecanismos de señalización mediados por los receptores Notch para regular el número de células M que se generan (Mabbott et al., 2013). Morfológicamente y funcionalmente los enterocitos y las células M son diferentes. Las células M tienen un glicocalix más reducido, un borde en cepillo más irregular y un número menor de microvellosidades. Además presentan una invaginación en su membrana basolateral, donde se suelen localizar linfocitos, macrófagos, o CD atraídas por el microambiente de receptores y quimiocinas que hay en ese espacio, para favorecer el transporte y la captación de los antígenos transportados por las células M hacia dichas células (Figura 5) (Corr et al., 2008; Neutra et al., 1996; Ohno, 2016).

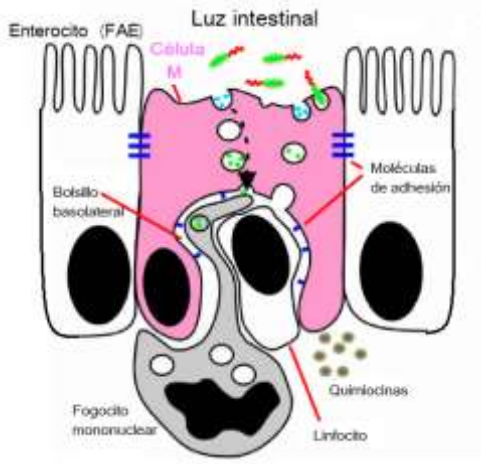


Figura 5. Representación de una célula M en el epitelio asociado al folículo (FAE). En su lado basolateral forma una invaginación donde se localizan linfocitos B y T, macrófagos y células dendríticas (CD) (Mabbott et al., 2013).

En relación con las enfermedades priónicas, las células M expresan la PrP^C (Nakato et al., 2009) y, aunque inicialmente hubo cierta controversia sobre si son estas células o los enterocitos los responsables de la captación del prion vía digestiva, parece demostrado que son una posible vía de entrada para este agente (Kujala et al., 2011). *In vitro* se ha comprobado que las células M pueden transportar el prion desde su lado apical hasta su membrana basolateral (Heppner et al., 2001; Miyazawa et al., 2010), mientras que en ratones se ha detectado el prion asociado a su lado apical e incluso en el interior de células M localizadas en el FAE a las pocas horas postinoculación vía oral (Foster & Macpherson, 2010; Takakura et al., 2011). De hecho, el número de células M está directamente relacionado con la susceptibilidad a la infección vía oral. Así, su depleción evita que los ratones se infecten vía oral mientras que el aumento en su densidad incrementa la captación del prion vía digestiva y, como consecuencia, disminuye el periodo de supervivencia (Donaldson et al., 2012; Donaldson et al., 2016). Este efecto resulta relevante ya que ciertas enfermedades inflamatorias intestinales o infecciones bacterianas inducen un aumento en el número de células M que podría generar una mayor susceptibilidad a la infección vía oral con priones.

Una vez captado el prion por parte de las células epieliales intestinales, es decir, los enterocitos y las células M, es tranferido a las células del sistema fagocítico nuclear encargadas de su transporte. Por ello, durante la siguiente fase de la infección, los macrófagos y las CD subepiteliales son clave.

2.2.3.c. Macrófagos

Los macrófagos y monocitos forman parte del sistema mononuclear fagocítico (van Furth et al., 1972). Según el tipo de respuesta que desencadenan, es decir, según lo que se denomina su proceso de polarización, se clasifican en macrófagos M1 (o proinflamatorios) y macrófagos M2 (o antiinflamatorios) (Gordon, 2003; Martinez & Gordon, 2014; Viola et al., 2019). Los M1 participan en respuestas microbicidas y antitumorales y se activan ante la detección de patrones moleculares asociados a peligro (PAMP) o por la acción de ciertas citoquinas como el factor de necrosis tumoral α (TNFα) y el interferón γ (IFNγ). La activación de estos macrófagos induce la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNFα, interleucina (IL)1β, IL6, IL12 e IL13) y especies reactivas de

oxígeno, como la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y de nitrógeno (NO). Su principal función es destruir patógenos y presentar sus antígenos a los linfocitos colaboradores tipo 1 (Th1) para activar la respuesta inmune adaptativa. Los M2 participan en las respuestas antiinflamatorias y en la reparación tisular. Su activación está comúnmente relacionada con la secreción de citoquinas como la IL10 o el factor de crecimiento transformante β (TGFβ), pero su clasificación es más compleja ya que se han descrito 4 subtipos de macrófagos M2, cada uno con funciones y marcadores celulares diferentes (Roszer, 2015). Sin embargo, esta clasificación en macrófagos M1 o M2 continúa siendo bastante limitada porque está basada mayoritariamente en experimentos realizados *in vitro*. La realidad es que en condiciones patológicas *in vivo* existe una amplia diversidad de fenotipos intermedios que incluso podrían expresarse simultáneamente (Martinez & Gordon, 2014).

Los macrófagos son células importantes en la patogenia de las enfermedades priónicas por su papel en la captación y propagación del prion y, al mismo tiempo, por su capacidad para degradarlo. Así, gracias a su localización en la SED de las PP y su capacidad para transportar antígenos transferidos por las células epiteliales intestinales, los macrófagos pueden vehiculizar el prion desde el epitelio intestinal hacia los tejidos linfoides más próximos (Figura 6) (Kujala et al., 2011; Takakura et al., 2011). Una vez ahí, numerosos estudios han demostrado la presencia del prion en el interior de los macrófagos localizados en folículos linfoides de las PP, linfonodos y bazo (Andreoletti et al., 2000; Jeffrey, Martin, Thomson, et al., 2001; Jeffrey, McGovern, Goodsir, et al., 2000; McGovern et al., 2004). Ahora bien, el tipo de macrófagos en los que se ha hallado el prion varía. Así, por ejemplo, se ha descrito en los macrófagos de cuerpo tingible (TBM) localizados en los centros germinales (CG) de folículos linfoides y en macrófagos del seno subcapsular de los linfonodos. Los TBM son un tipo de macrófagos de origen todavía desconocido, caracterizados por tener una gran capacidad fagocítica pero ser poco eficaces presentando antígenos (Da Silva et al., 2017). Además de eliminar los restos de las células B apoptóticas y de las CDF, los TBM también son capaces de reducir la respuesta inmune del CG eliminando los antígenos liberados por las CDF en forma de icosomas para así impedir la activación de más linfocitos (Gotur & Wadhwan, 2020; Kranich & Krautler, 2016; Smith et al., 1998). Por tanto, la detección del prion en el interior de los TBM sugiere que estos macrófagos podrían degradarlo (Heggebo et al., 2002; Jeffrey, McGovern, Martin, et al., 2000; McGovern & Jeffrey, 2007). De hecho, *in vitro* se ha demostrado que los macrófagos son capaces de degradar el prion en el interior de sus lisosomas y proteasomas y que dicho proceso puede ser acelerado mediante la estimulación de los cultivos con moléculas como por ejemplo lipopolisacáridos (LPS) (Rybner-Barnier et al., 2006; Sassa, Inoshima, et al., 2010; Sassa, Yamasaki, et al., 2010). Asímismo, el hallazgo de diferentes cepas de priones en el interior de TBM, desde cepas de scrapie, de EEB o vECJ, tanto en la especie murina, ovina como humana, sugiere que estas células participan activamente en las principales enfermedades priónicas independientemente de la especie infectada (Hilton et al., 2004; Jeffrey et al., 2003; Jeffrey, McGovern, Martin, et al., 2000).

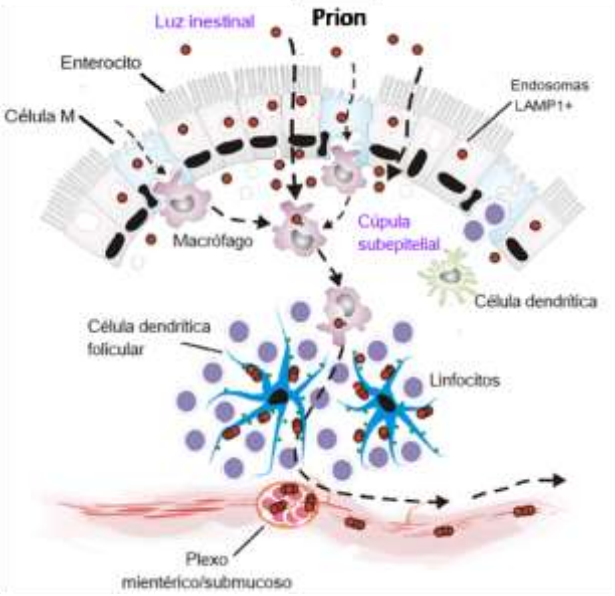


Figura 6. Células implicadas en la captación del prion a nivel intestinal y ruta seguida por el prion hasta infectar las células dendríticas foliculares (CDF) para replicarse y diseminarse vía sanguínea y linfática (Kujala et al., 2011).

2.2.3.d. Células dendríticas

Las CD son células presentadoras de antígenos (CPA) localizadas tanto en órganos linfoides como no linfoides. Son consideradas células centinela ya que su principal función es la detección de antígenos a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR) con la consiguiente captación, procesamiento y transporte de los mismos vía linfática hacia los órganos linfoides secundarios (Satpathy et al., 2012).

Una de las peculiaridades de las CD es su capacidad para almacenar durante horas o incluso días los antígenos fagocitados sin degradarlos. Esta propiedad se debe a que el pH de sus fagolisosomas se mantiene a un nivel lo suficientemente elevado para que las enzimas no puedan actuar hasta que las CD maduran, un proceso que ocurre mientras la CD viaja hacia los tejidos linfoides periféricos para presentar los antígenos captados (Trombetta et al., 2003). Una vez allí, las CD presentan los antígenos ya degradados y convertidos en péptidos de menor tamaño en su superficie celular asociados al complejo mayor de histocompatibilidad II (CMH-II) a linfocitos T y B (Lee & Iwasaki, 2007). Pero además de actuar en la respuesta inmune innata, las CD también están involucradas en la regulación de los linfocitos T CD4 (Th1, Th2, Th17) y CD8, así como en los mecanismos de tolerancia inmunológica asociada a los linfocitos Treg. Por ello, se dice que las CD actúan como un puente de unión entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (Sato & Fujita, 2007).

Las CD surgen a partir de células madre hematopoyéticas de la médula y tienen dos posibles orígenes mieloide y linfoide. Ambas estirpes pueden dar lugar a CD aunque la mayoría proceden de la estirpe mieloide (Merad et al., 2013). Resulta importante conocer los tipos de CD ya que la activación de una u otra, incluso con los mismos estímulos o ligandos, activa rutas celulares diferentes (Iwasaki & Kelsall, 2001). Sin embargo, la detección y clasificación de las CD es compleja ya que se trata de una estirpe celular con múltiples funciones y heterogéneos mecanismos de diferenciación, maduración y activación. Como consecuencia, aunque se han

descrito diversos marcadores celulares para su identificación y caracterización, no hay un único marcador específico de CD (Sato & Fujita, 2007). En la especie murina se han descrito tres subtipos principales de CD en el intestino teniendo en cuenta sus marcadores celulares (Iwasaki & Kelsall, 2001):

- CD clásicas tipo 1 (cCD1): son células $CD11b^-$ $CD8\alpha^+$ localizadas en la región interfolicular (IFR) de las PP. Este tipo de CD es de origen linfoide.
- CD clásica tipo 2 (cCD2): comúnmente reconocidas por ser $CD11b^+$ y tener un origen mieloide. Este tipo de CD comparte varios marcadores en común con los macrófagos, como por ejemplo $CD11c^+$ y el CMH-II. Las cCD2 se localizan en la zona de la SED de las PP y en las vellosidades intestinales.
- CD doble negativas: son $CD11b^-$ $CD8\alpha^-$. Se encuentran en la cúpula, la región IFR y en el FAE de las PP. Expresan también CMH-II pero en su espacio intracelular.

En el caso de la especie ovina la mayoría de las CD presentes en la SED, la IFR y la lámina propia del intestino son $CD11c^+CD205^+CMHII^+$, pero también se ha detectado otra población $CD11c^-$ $CD205^+CD11b^-CMHII^+$ en los folículos de las PP (Akesson et al., 2008).

En las enfermedades priónicas, varios estudios han colocalizado el prion con CD ubicadas en los vasos quilíferos de las vellosidades intestinales, en las IFR de las PP o en los senos subcapsulares de linfonodos (Jeffrey et al., 2006; Piercey Akesson et al., 2012; Ryder et al., 2009). Esto sugiere que las CD, de un modo similar a los macrófagos, captan el prion situándose justo debajo del FAE, en estrecho contacto con los enterocitos y células M, o emitiendo prolongaciones directamente hacia la luz intestinal (Figura 7) (Defaweux et al., 2005; Rescigno et al., 2001) atraídas por el propio prion o por quimiocinas liberadas por las células epiteliales (Chabot et al., 2008; Kaneider et al., 2003).

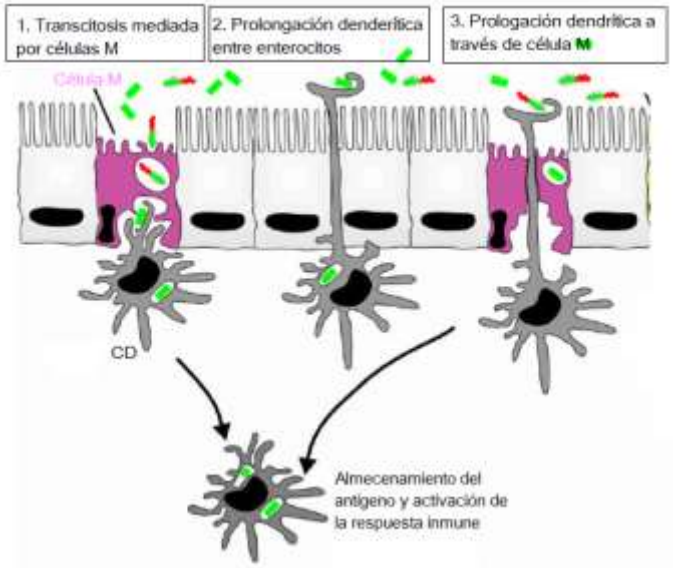


Figura 7. Métodos de captación de antígenos desarrollados por las células dendríticas (CD). (1) Localización de las CD en el lado basolateral de las células M. (2 y 3) Prolongaciones emitidas por las CD para captar directamente antígenos de la luz intestinal (Mabbott et al., 2013).

Tras captar el prion, las CD viajan por el sistema linfático hacia los tejidos linfoides donde establecen un contacto directo con linfocitos T, linfocitos B, CDF e incluso con fibras nerviosas del SNP (Defaweux et al., 2005). Una vez allí, debido a las características intrínsecas de la PrP^{Sc}, las CD no son capaces de degradar de forma correcta la PrP^{Sc} para presentar algunos de sus péptidos asociados a su CMH-II y poder así desencadenar una respuesta inmune de tipo humoral eficaz (Zabel & Avery, 2015). No obstante, el estrecho contacto entre las CD y dichas células facilita la propagación del prion, bien a través de exosomas (Castro-Seoane et al., 2012; Cherry & Gilch, 2020; Fevrier et al., 2004; Klohn et al., 2013) o incluso mediante la formación de nanotubos con células del SNP generando una vía de neuroinvasión directa (Mabbott & Bradford, 2015; Zhu et al., 2015).

De cualquier forma, la internalización del prion por parte de las CD no resulta inocua para éste. Estudios *in vitro* han demostrado que las CD pueden degradar el prion mediante unas enzimas lisosomales denominadas cisteín-proteasas (Huang et al., 2002; Luhr et al., 2004; Luhr et al., 2002) y que dicho proceso, al igual que en los macrófagos, se acelera mediante la estimulación con LPS (Rybner-Barnier et al., 2006). Sin embargo, aunque esta degradación reduce la infectividad asociada a las CD (Rybner-Barnier et al., 2006), es posible que las CD no sean capaces de eliminar por completo el agente. De hecho, durante el proceso de degradación del prion en el interior de las CD pueden generarse péptidos potencialmente infecciosos (Luhr et al., 2004; Luhr et al., 2002). Esto explica por qué estas células continúan teniendo capacidad infectiva al ser inoculadas en ratones a pesar de que sean capaces de degradar, al menos en parte, el prion (Aucouturier et al., 2001; Rybner-Barnier et al., 2006).

Todos estos estudios otorgan a las CD un papel relevante en la patogenia de las enfermedades priónicas pues no solo participan en la entrada del agente vía oral, sino que además contribuyen a la diseminación del mismo. Es más, su depleción antes de la infección vía intraperitoneal o vía oral prolonga significativamente el periodo de supervivencia en la especie murina (Cordier-Dirikoc & Chabry, 2008; Raymond et al., 2007). Asimismo, la inhibición del receptor necesario para la migración CD $CD11c^{+}$ hacia los folículos linfoides, el $CXR5^{\Delta DC}$, en ratones inoculados vía oral también alarga su periodo de supervivencia (Bradford et al., 2017). Todos estos datos apuntan a las CD como unas células clave para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas en las enfermedades priónicas (Bachy et al., 2010).

2.2.3.e. Células dendríticas plasmocitoides

Las CD plasmocitoides (CDp) son células de origen hematopoyético y, al igual que las CD, pueden desarrollarse a partir de precursores de origen linfoide o mieloide (Colonna et al., 2004; Rodrigues et al., 2018). Inicialmente fueron descritas como células plasmáticas por su morfología redondeada y la expresión de marcadores celulares como CD4, CD123 o CD68, pero posteriormente se clasificaron como un tipo de CD (Lombardi & Khaiboullina, 2014). Las CDp tampoco expresan un marcador celular específico, por lo que su estudio requiere el análisis conjunto de varios marcadores (Summerfield et al., 2015).

A diferencia de las CD, que se ubican en los tejidos periféricos donde actúan como células centinela, las CDp se desplazan por la sangre y migran hacia los tejidos periféricos atraídas por

estímulos inflamatorios donde actúan regulando la respuesta inmune (Yoneyama et al., 2004). En estado de reposo son células con poca habilidad para presentar antígenos ya que, en comparación con otras CD, tienen una menor capacidad para la endocitosis y expresan niveles bajos de CMH-II. Sin embargo, su activación conlleva un cambio morfológico y un aumento en la expresión del CMH-II, así como otras moléculas y citoquinas que regulan la estimulación de linfocitos T (CD8 y CD4), linfocitos B y células naturales asesinas (NK) (Colonna et al., 2004; Yrlid, Cerovic, et al., 2006).

La principal característica de las CDp es su capacidad para producir IFN tipo I (IFNα e IFNβ) e IFN tipo III, aunque también sintetizan otras citoquinas como TNFα, IL6 y quimiocinas (Chistiakov et al., 2014; Reizis, 2019). Esta capacidad se debe, por una parte, a la alta expresión de dos receptores endosomales, el TLR7 y 9 (Iwasaki & Medzhitov, 2004) que desencadenan la activación de la vía MyD88-TRAF6-IRF7 (Colonna et al., 2004), y por otra, a los altos niveles de expresión de factor de regulación del interferón (IRF) 7 que incluso en estado basal están aumentados respecto a otras células (Pascale et al., 2008).

Si bien el papel de las CD clásicas ha sido muy estudiado en las enfermedades priónicas, el de las CDp es mucho más reducido porque sus funciones se asocian comunmente con la respuesta inmune frente a las enfermedades víricas (Iwasaki & Medzhitov, 2004). Además expresan niveles bajos de PrP^C (Martinez del Hoyo et al., 2006; Rybner-Barnier et al., 2006) y algunos estudios afirman que una vez se activan pierden su capacidad para migrar vía linfática, por lo que tampoco podrían jugar un papel en el transporte del prion (Yrlid, Cerovic, et al., 2006). Sin embargo, otros estudios han demostrado que las CDp de la especie ovina pueden migrar vía linfática y transportar antígenos hasta los linfonodos regionales tras ser activadas en los tejidos periféricos (Pascale et al., 2008). Asimismo, estudios *in vitro* también han demostrado que las CDp murinas pueden captar una cepa de EEB adaptada a dicha especie y degradarla (Rybner-Barnier et al., 2006). Incluso se ha descrito que las CDp podrían tener más capacidad que otras células, como por ejemplo las CD clásicas y macrófagos, para captar y acumular el prion *in vivo* (Castro-Seoane et al., 2012). Todo ello refleja que el conocimiento que se tiene de las CDp en las enfermedades priónicas es todavía limitado y que probablemente se desconocen las funciones y mecanismos que desarrollan en estas enfermedades.

2.2.3.f. Las células dendríticas foliculares

Las CDF, pese a la similitud en su morfología dendrítica, no son un tipo de CD. Las CDF no tienen un origen hematopoyético, sino que son generadas a partir de pericitos caracterizados por la expresión del receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Aguzzi et al., 2014; Krautler et al., 2012). En los folículos linfoides las CDF se localizan en la zona oscura y en la zona clara del CG donde desarrollan múltiples funciones (Allen & Cyster, 2008; Kranich & Krautler, 2016; Krautler et al., 2012; Park & Choi, 2005): (1) atraen a las células B y CD hacia los folículos linfoides liberando quimiocinas, (2) aportan factores de activación de células B y secretan moléculas antiapoptóticas para la supervivencia de las células B, (3) controlan la fagocitosis de células B apoptóticas que no han desarrollado una correcta afinidad frente al antígeno o incluso que adquieren una autoreactividad mediante la secreción del factor 8 de la proteína globular de la grasa de la leche (Mfge8) y (4) presentan inmunocomplejos a las células B para inducir su

proliferación y diferenciación en células plasmáticas o células B de memoria. Las CDF captan los inmunocomplejos formados por un antígeno y un anticuerpo o un antígeno unido a un factor del complemento) que circulan por la sangre o la linfa y los exponen sin procesarlos en su superficie para presentárselos a las células B. Dichos inmunocomplejos quedan adheridos a la superficie de sus dendritas, formando unas estructuras llamadas icosomas, para posteriormente ser liberados y rápidamente captados por los linfocitos B de los CG o endocitados por los TBM (Kranich & Krautler, 2016). Para exponer los inmunocomplejos en su superficie, las CDF no utilizan el CMH-II, sino receptores Fc, como por ejemplo CD32 y CD23, o receptores del complemento, como CD21 (C3d) y CD35 (C3b). Esta función de presentación de inmunocomplejos está asociada principalmente con las CDF de la zona clara del folículo linfoide ya que expresan más FcR y receptores del complemento (Rezk et al., 2013).

En relación con las enfermedades priónicas, muchos estudios han colocalizado el prion con las CDF, tanto en la especie murina (Kujala et al., 2011; McGovern et al., 2009), ovina (Andreoletti et al., 2000; van Keulen et al., 1996) como humana (Hill et al., 1997) en diferentes tejidos linfoides. Hasta el momento no se han establecido con certeza los mecanismos empleados por el prion para llegar a contactar con las CDF ya que o bien viaja libre (no asociado a células), o es transportado por ciertas células como por ejemplo macrófagos o CD hasta los folículos linfoides (Mabbott & Bruce, 2002). Una vez llega hasta las CDF, estas células se sirven del sistema del complemento y de sus receptores para anclar el prion sobre la superficie de sus dendritas (Klein et al., 2001). Varios estudios han evidenciado que deficiencias causadas experimentalmente en el sistema de complemento, disminuyen los depósitos de PrP^{Sc} y prolongan los periodos de supervivencia (Klein et al., 2001; Mabbott et al., 2001). Por otro lado, además de expresar de forma constitutiva la PrP^{c}, estas células son un factor clave para la replicación prion (K. L. Brown et al., 1999). Tal es su importancia que su deficiencia reduce significativamente la acumulación de la PrP^{Sc} en el SLR y posterior neuroinvasión (Mabbott & Bruce, 2002; Prinz et al., 2002) y por ello han sido consideradas como posible diana terapéutica (Mabbott et al., 2003; Montrasio et al., 2000).

La infección de las CDF por parte del prion tiene importantes repercusiones en su proceso de maduración y en su morfología. Por microscopía electrónica se ha observado que las CDF infectadas desarrollan procesos dendríticos con alteraciones morfológicas, expresan mayores niveles de ubiquitina en su membrana plasmática y acumulan un exceso de inmunoglobulinas e inmunocomplejos (McGovern & Jeffrey, 2007; McGovern et al., 2009). Esta técnica también ha permitido descubrir que, aunque inicialmente el prion queda anclado a la superficie de las dendritas de las CDF, el material proteico acaba agregándose y formando fibrillas que de algún modo se sueltan de las dendritas y quedan retenidas en el espacio extracelular (McGovern et al., 2004). Tras su infección, se desconoce qué sucede con estas células ya que podrían morir o sobrevivir gracias al desarrollo de mecanismos de supervivencia que les permitieran eliminar total o parcialmente la PrP^{Sc} de su superficie y regresar a un estado normal (McGovern et al., 2009). Sea cual sea su desenlace, la detección en el interior de TBM de fragmentos de sus dendritas o restos celulares de CDF junto con PrP^{Sc} indica que estos macrófagos se encargan finalmente de fagocitar y degradar, al menos en parte, esta PrP^{Sc} anclada a su superficie (Figura 8) (Herrmann et al., 2003).

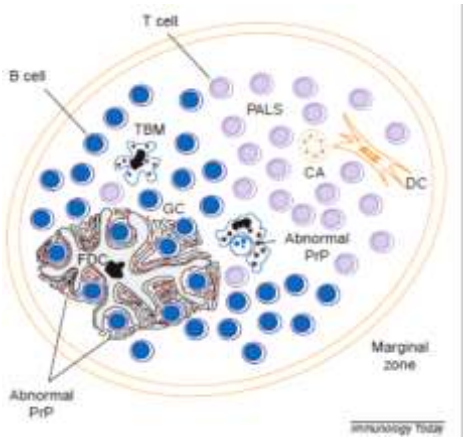


Figura 8. Disposición de las células dendríticas foliculares (CDF) en el centro germinal (CG) de un folículo linfoide exponiendo en su superficie la PrP^{Sc} y en estrecho contacto con las células B y los macrófagos de cuerpo tingible (TBM) en cuyos lisosomas también se representa la PrP^{Sc} (Bruce et al., 2000).

Por último, aunque existen numerosas explicaciones sobre los mecanismos de propagación del prion entre el sistema linfoide y nervioso, parece que otro factor importante en la patogenia en las enfermedades priónicas es la proximidad de las CDF al SNP ya que su cercanía parece facilitar la velocidad de neuroinvasión (Prinz, Heikenwalder, et al., 2003).

2.2.3.g. Linfocitos

Los linfocitos T y B son las principales células de la respuesta inmune adaptativa y se originan en la médula ósea a partir de células progenitoras linfoides (Iwasaki & Akashi, 2007). Aunque son células que de forma constitutiva expresan la PrP^{C} (Cashman et al., 1990), inicialmente se subestimó su participación en las enfermedades priónicas al no detectarse una respuesta inmune específica frente al prion. No obstante, el estudio del SLR en estas enfermedades poco a poco fue revelando importantes funciones llevadas a cabo por los linfocitos. Las primeras investigaciones evidenciaron que ratones con inmunodeficienca combinada grave, es decir, que no poseen ni linfocitos T ni B, eran resistentes a la infección vía intraperitoneal con scrapie (O'Rourke et al., 1994). Años más tarde, Raeber y colaboradores aislaron linfocitos T y B del bazo de ratones con scrapie y demostraron la presencia del prion en dichas células (Raeber et al., 2001). Paralelamente, Aucouturier y colaboradores corroboraron la capacidad infectiva de los linfocitos B al infectar ratones con linfocitos B extraídos de bazos de ratones con scrapie (Aucouturier et al., 2001). De este modo, el interés por los linfocitos en las enfermedades priónicas fue creciendo y, aunque por el momento no hay estudios que demuestren que los linfocitos sean capaces de replicar el prion, se ha demostrado que cumplen otras funciones necesarias para la infección. Sin embargo, los linfocitos T, a diferencia de los linfocitos B, son células poco involucradas en las enfermedades priónicas. Tanto es así que la depleción de los linfocitos T en la especie murina no impide la infección por vía periférica y mucho menos afecta a la vía de inoculación intracerebral (Klein et al., 1997; Klein et al., 1998). Asimismo, la sobreexpresión de la PrP^{C} en los linfocitos T tampoco favorece la infección (Raeber et al., 1999; Raeber et al., 2001; Weissmann et al., 2001). Por el contrario, la depleción de los linfocitos B evita la neuroinvasión en la mayoría de los casos y, en los que no, alarga el periodo de supervivencia (Frigg et al., 1999; Klein et al., 1997). Ahora bien, el efecto de los linfocitos B en las enfermedades priónicas es mayoritariamente indirecto ya que su

función está más relacionada con la maduración de las CDF y su mantenimiento en un estado diferenciado que con efectos sobre el propio prion (Mabbott & Bruce, 2001). Así pues, se ha determinado que la sobreexpresión de la PrP^C en los linfocitos B no aumenta la velocidad de la patogenia, por lo que estas células no son un factor limitante para su replicación (Raeber et al., 1999). Sin embargo, la expresión de la PrP^C sí que es necesaria para detectar infectividad en los linfocitos B, hecho que sugiere que a pesar de que no son capaces de replicar el prion, pueden captarlo de otras células como por ejemplo de las CDF (Raeber et al., 2001; Weissmann et al., 2001)

Asimismo, durante años se planteó la posibilidad de que los linfocitos fueran capaces de transportar el prion vía sanguínea o linfática, pero los primeros estudios que investigaron esta hipótesis no pudieron corroborarla (Raeber et al., 1999; Weissmann et al., 2001). Posteriormente sí que se ha demostrado que los linfocitos B circulantes pueden ser infectivos (Douet et al., 2016; Hunter et al., 2002; Mathiason et al., 2010).

En resumen, resulta evidente que, pese a que las enfermedades priónicas no se caracterizan por inducir la generación de una respuesta inmune específica, los linfocitos, y en particular los tipo B, están involucrados en su patogenia. No obstante, aunque de forma natural la función de los linfocitos T no sea relevante, sí podría serlo para el desarrollo de inmunoterapias diseñadas para la generación de linfocitos T capaces de reconocer ciertos péptidos inmunogénicos de la proteína prion y así alargar, o incluso prevenir, el desarrollo de la enfermedad (Carnaud & Bachy, 2010; Ma & Ma, 2020)

2.2.4. Factores que influyen en la infección vía oral con scrapie

Tal y como se ha ido comentando, factores como la edad o el genotipo son determinantes para el éxito o el fracaso de la infección vía oral con scrapie. Sumados a estos factores, la dosis de prion a la que el animal se ve expuesto es otro factor clave para la infección vía oral. Dada la importancia de estos tres factores en el scrapie y en el diseño experimental de esta Tesis Doctoral, a continuación se profundiza sobre cada uno de ellos.

2.2.4.a. La edad

Aunque no se han establecido con certeza las razones por las que la edad influye en la susceptibilidad a la infección, existen evidencias que demuestran que el riesgo de infección con scrapie es mayor en los animales jóvenes y, especialmente, durante sus primeras horas de vida. Este fenómeno está asociado por una parte al tipo de placentación epiteliocorial que presentan los rumiantes que impide el paso de inmunoglobulinas maternas al feto durante la gestación. Debido al tipo de placenta, las primeras horas de vida de un cordero son cruciales para la captación de inmunoglobulinas maternas y factores del crecimiento procedentes del calostro. Como consecuencia, durante sus primeras 48 horas de vida, la permeabilidad intestinal es mayor gracias a que sus enterocitos tienen mayor capacidad de endocitosis para poder captar proteínas de gran tamaño como las inmunoglobulinas (Ano et al., 2008; Khan & Ahmad, 1997; Westrom et al., 2020). Además, durante ese periodo la actividad proteolítica del sistema digestivo está disminuida por la presencia de antiproteasas en el calostro (Khan & Ahmad, 1997). Asimismo, durante el periodo neonatal la capacidad de digestión es limitada ya que el estómago todavía es

inmaduro y la función pancreática es limitada (Westrom et al., 2020). Como consecuencia de la mayor capacidad de absoción y la menor degradación del prion vía digestiva, el riesgo de infección con scrapie se incrementa en el periodo neonatal. Así por ejemplo, se ha observado que la dosis de inoculación requerida para infectar corderos de un día de vida es mucho menor que la necesaria para infectar corderos de cuatro meses de edad (Andreoletti et al., 2006; Hamir et al., 2009; Hamir et al., 2005).

Otro factor asociado al mayor riesgo de infección a edades tempranas en el ganado ovino, es la cantidad de GALT y, en concreto, la densidad de tejido linfoide en el intestino delgado. Las PP son agregaciones de folículos linfoides situadas en la lámina propia del borde antimesentérico intestinal, recubiertas por un epitelio especializado y con una cúpula subepitelial (donde se localizan linfocitos, macrófagos y CD), entre las cuales se dispone una zona de tejido linfoide difuso conocida como IFR (Jung et al., 2010). La principal función de las PP es la captación de antígenos de la luz intestinal y la estimulación de la respuesta inmune hacia mecanismos defensivos o de tolerancia. Los rumiantes cuentan con PP distribuidas por todo su intestino: en el yeyuno, íleon, válvula ileocecal, colon, recto y ano. La particularidad de los rumiantes es que nacen con unas 25-40 PP yeyunales y una única PP ileal que puede llegar a medir hasta tres metros. A lo largo de la vida del animal, la PP del íleon involuciona reduciendo su tamaño hasta alcanzar sus dimensiones definitivas a los 15-18 meses de edad en la especie ovina, mientras que la yeyunal persiste en los animales adultos sin grandes cambios (St Rose et al., 2007). Esta involución de las PP y consecuentemente su densidad está relacionada epidemiológicamente con el riesgo de infección vía oral con scrapie, de modo que, cuanto menor es la cantidad de tejido linfoide en el intestino, menor es el riesgo de infección (St Rose et al., 2007; St Rose et al., 2006).

2.2.4.b. El genotipo

Como se ha explicado anteriormente, el genotipo para el gen *PRNP* ovino influye de forma decisiva sobre la susceptibilidad o resistencia al scrapie y en el periodo de incubación de esta enfermedad. Ahora bien, teniendo en cuenta que uno de los objetivos de esta tesis es analizar el efecto del genotipo ovino en la infección con scrapie, cabe plantearse si el genotipo de la oveja infectada con scrapie o "donante" es determinante para la infección de otro animal de la misma especie. Gracias al estudio de González y colaboradores en el que se analizó el efecto de inoculaciones vía oral con inóculos homólogos o heterólogos (es decir, con genotipo idéntico o diferente entre el animal donante y receptor) en la especie ovina, se puede afirmar que, aunque el grado de homología entre el donante y el receptor es importante, ya que parece disminuir el periodo de incubación, el genotipo del receptor es el que realmente determina el éxito o el fracaso de la inoculación (Gonzalez et al., 2012). No obstante, el genotipo parece no ser determinante en el momento de la captación del prion vía intestinal ya que, tal y como demuestran Jeffrey y colaboradores en corderos, independientemente del genotipo susceptible (ARQ/ARQ) o resistente (ARR/ARR) del receptor, el inóculo de scrapie atraviesa el epitelio intestinal y, durante las primeras horas postinoculación, puede ser detectado en los senos subcapsulares y medulares de los linfonodos mesentéricos asociado a macrófagos o CD (Jeffrey et al., 2006). Este hallazgo fue respaldado por Kujala y colaboradores al describir un fenómeno parecido en ratones (Kujala et al., 2011). En este caso, su estudio demostró que no había diferencias en la captación del inóculo vía oral entre ratones que expresaban la PrP^C y otros que

no ($Prnp^{-/-}$), detectando en ambos los neurofilamentos procedentes del inóculo en las PP murinas. Consecuentemente, estos estudios apuntan a que la expresión de la PrP^C y el genotipo son determinantes para las primeras fases de replicación del prion pero no para su captación vía digestiva. De hecho, ambos estudios detectan que, pasadas unas horas postinoculación, la señal del inóculo desaparece y solo vuelve a ser detectable en los corderos susceptibles a los 30 días postinoculación y en los ratones que expresaban la PrP^C a los 7 días postinoculación (Jeffrey et al., 2006; Kujala et al., 2011).

2.2.4.c. La dosis y su administración

La dosis de inóculo que debe administrarse vía oral en corderos y ovejas adultas para emular de la forma más real posible la infección natural y así poder estudiar de forma experimental la patogenia del scrapie ha sido objeto de numerosos estudios. Se han probado dosis de inoculación vía oral diferentes, desde 0.1g a 5g, aplicadas como dosis únicas o múltiples, e incluso administrándolas en la cavidad oral o introduciéndolas con una sonda directamente en el estómago (Gonzalez, Pitarch, Martin, Thurston, Moore, et al., 2014; Greenlee et al., 2016; Ryder et al., 2009). Parece lógico pensar que cuanto mayor sea la dosis de infección vía oral, mayor debería ser la tasa de infección y menor el periodo de supervivencia. Sin embargo, esta afirmación no es del todo correcta. Se ha comprobado que el uso de dos dosis diferentes (1g y 5g) para la inoculación vía oral de corderos con genotipo susceptible y de aproximadamente dos semanas de edad con scrapie clásico, no genera diferencias en el periodo de incubación, en la evolución de la patogenia, ni en la tasa de infección (Gonzalez, Pitarch, Martin, Thurston, Moore, et al., 2014; Ryder et al., 2009). De hecho, la dosis más baja publicada con capacidad para infectar con scrapie a corderos vía oral ha sido de 0.1g, causando una tasa de infección del 100% en corderos susceptibles ARQ/ARQ pero del 0% en corderos ARQ/ARR (Greenlee et al., 2016). En ovejas adultas también se han descrito inoculaciones orales con scrapie clásico probando diferentes dosis y los resultados reflejaron que, al igual que en los corderos, la tasa de infección puede ser alta en ovejas con genotipo susceptible (incluso infectándolas con una dosis de 0.5g) y nula en las ovejas con genotipo resistente independientemente de la dosis empleada (Foster, Parnham, Chong, et al., 2001; O'Rourke et al., 1997).

Estos resultados, junto con el estudio llevado a cabo por McGovern y colaboradores en el que se inocularon ovejas vía oral con EEB bovina y ovina utilizando también diferentes dosis (McGovern et al., 2016), evidencian que en las inoculaciones vía oral con priones existe una dosis mínima para lograr infectar al animal y una dosis máxima que si se supera no aumenta la tasa de ataque. Asimismo, demuestran que la dosis no influye en el periodo de supervivencia y, por tanto, en la eficiencia con la que el prion se replica y propaga por el organismo.

2.3. El sistema nervioso central: respuesta frente al prion

Una vez alcanza el prion el SNC, comienza una degeneración progresiva del tejido nervioso caracterizada por los depósitos de PrP^{Sc}, las alteraciones sinápticas, los cambios espongiformes, la inflamación del SNC y la muerte neuronal (Budka, 2003). Aunque la conversión de la PrP^C en PrP^{Sc} es lo más distintivo de estas enfermedades, se desconocen los mecanismos por los cuales ese proceso acaba resultando tan neurotóxico. Una de las hipótesis que se planteó es que la pérdida de las funciones neuroprotectoras normales de la PrP^C relacionadas con la apoptosis, el estrés

oxidativo, la señalización celular, la mielinización, o la sinapsis, podría ser la causa de la neurodegeneración. Sin embargo, estudios realizados con ratones que no expresaban la PrP^{c} ($PrP^{-/-}$) evidenciaron que la pérdida de las funciones fisiológicas de la PrP^{C} no generaban alteraciones importantes (Bueler et al., 1993; Mallucci et al., 2003). Por tanto, la falta de la expresión de esos efectos neuroprotectores no explica las lesiones tan severas que aparecen en el SNC en las EET. La otra posibilidad es que la PrP^{Sc} tuviera un efecto neurotóxico. A favor de esta teoría se ha observado una correlación entre la localización de los depósitos de PrP^{Sc} y las áreas del SNC más dañadas y se ha determinado *in vitro* que pequeñas concentraciones de PrP^{Sc} purificada son neurotóxicas para las células al inducir su apoptosis (Hetz et al., 2003). No obstante, a pesar de la evidente correlación entre la PrP^{Sc} y la neurodegeneración, la PrP^{Sc} no parece ser la causa de directa de la neurotoxicidad, ya que se han descrito algunos casos en los que la enfermedad se desarrolla pero no se detecta la PrP^{Sc} (Lasmezas et al., 1997) y otros en los que se detectan grandes cantidades de PrP^{Sc} pero no signos de neurodegeneración (Piccardo et al., 2007). En este sentido, el hecho de que la falta de expresión de la PrP^{C} confiera resistencia a la infección experimental (Weissmann et al., 1994) y que el bloqueo de su expresión en ratones con una enfermedad priónica ya instaurada sea capaz de revertir la degeneración espongiforme y la muerte neuronal en las fases iniciales (Mallucci et al., 2003; Mallucci et al., 2007), sugiere que la neurotoxicidad está mediada por la expresión de la PrP^{C}. De este modo, los estudios con ratones que expresan la PrP^{C} sin GPI, es decir, no anclada a la membrana plasmática, evidencian la ausencia de signos clínicos y el desarrollo de una neurodegenración notablemente más leve pese a la acumulación de PrP^{Sc} en el SNC (Chesebro et al., 2005). Este hecho, además de apoyar la idea de que la PrP^{C} es el mediador clave para la neurotoxicidad, demuestra que su localización en la membrana plasmática es necesaria para el proceso de neurodegeneración y revela la importancia del anclaje GPI como transductor de señales al estar integrado en la membrana plasmática.

Pero si todos estos estudios apuntan hacia la disociación entre los agregados de PrP^{Sc} y la neurotoxicidad, surge la duda de cuál es la molécula responsable de dicho efecto. Algunos autores proponen que la toxicidad depende de formas oligoméricas intermedias formadas durante la conversión de la PrP^{C} en PrP^{Sc} (Baskakov et al., 2002) que podrían tener propiedades neurotóxicas (Kazlauskaite et al., 2005) y ser infectivas (Silveira et al., 2005). De cualquier modo, sea cual sea la molécula neurotóxica, actualmente las rutas metabólicas que se activan para desencadenar la neurotoxicidad tampoco se han identificado con precisión.

2.3.2. La neuroinflamación y su asociación con la neurodegeneración.

Originalmente el término neuroinflamación surgió para hacer referencia a la respuesta inmunitaria desencadenada en el SNC frente a infecciones, lesiones traumáticas, metabolitos tóxicos o enfermedades autoinmunes. Sin embargo, hoy en día el concepto de neuroinflamación en las enfermedades neurodegenerativas es más amplio y conlleva el desarrollo de una respuesta glial crónica e insidiosa regulada por mediadores de la inflamación, principalmente citoquinas (Ransohoff, 2016; Waisman et al., 2015). Por ello, la neuroinflamación es considerada una característica patológica común entre las enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (AD), Parkinson (PD), la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y las enfermedades priónicas, entre muchas otras, y está claramente asociada con la neurodegeneración (Ransohoff, 2016; Stephenson et al., 2018). Como consecuencia, en la última década la investigación de la

neuroinflamación en este tipo de enfermedades, y en concreto en las enfermedades priónicas, ha sido objeto de numerosos estudios ya que desentrañar los mecanismos desencadenados por la respuesta inmune resultaría clave para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas.

Inicialmente, una de las características principales que definían a las EET era la ausencia de una respuesta inmunitaria específica, teoría sustentada por el desarrollo de una tolerancia inmunológica frente a la PrP^{Sc} al tratarse de una proteína de origen endógeno similar a la PrP^{C} (Porter et al., 1973). Sumado a ello, el tejido diana del prion, el SNC, se consideraba un sitio "inmunológicamente privilegiado" por la presencia de una barrera hematoencefálica que se consideraba completamente impermeable. Además, fuera del SNC no se observaba una respuesta inflamatoria en torno a los depósitos de PrP^{Sc} en los tejidos periféricos. Sin embargo, actualmente está ampliamente demostrado la activación de la respuesta inmune e inflamatoria en el SNC, evidenciada por la reactividad y proliferación de la microglía y astroglía, una respuesta que precede incluso a la manifestación de los signos clínicos y a la neurodegeneración (Sandberg et al., 2014; Vincenti et al., 2015). Además, estudios recientes revelan que el neurotropismo del prion, asociado al tipo de cepa priónica, es un factor íntimamente relacionado con el grado de neuroinflamación detectado en las diferentes regiones del SNC (Carroll et al., 2016; Franceschini et al., 2018). Este fenómeno es especialmente notorio en la fase preclínica de la enfermedad, en la que pueden detectarse diferencias en el grado de neuroinflamación entre las regiones por las que el prion muestra un mayor o menor tropismo aunque, conforme la enfermedad progresa, esas diferencias desaparecen y predomina una respuesta proinflamatoria común en todo el SNC (Makarava, et al., 2020). No obstante, dado que la sola presencia del prion en el SNC parece no ser el factor desencadenante de la neurodegeneración (Alibhai et al., 2016), otros factores como los niveles de sialilación de la PrP^{Sc} (Makarava, Chang, & Baskakov, 2020; Srivastava et al., 2018) y/o las diferencias observadas en el fenotipo astroglial y microglial entre las diferentes regiones del SNC (Bachiller et al., 2018; Makarava et al., 2019) podrían ser la clave de la diferente vulnerabililidad de cada región a la infección. Así, un estudio señala que en las regiones donde la neurodegeneración es más leve la microglía expresa genes asociados con la regulación homeostática, mientras que en las regiones más lesionadas expresa genes relacionados con la respuesta inmune (Alibhai et al., 2016).

Por todo ello, la activación glial es considerada el pilar central de la de la patogenia de las enfermedades priónicas a pesar de que por el momento se desconoce en gran medida cuáles son los mecanismos moleculares que desencadenan esta respuesta y cuáles son sus consecuencias exactas (Aguzzi & Zhu, 2017; Obst et al., 2017). A continuación se profundiza en los estudios más recientes que han investigado la respuesta de cada tipo glial frente al prion.

2.3.3. La microglía y su respuesta frente al prion

La microglía es la célula del sistema inmunitario más importante del SNC y constituye el 5-10% del total de las células del SNC. Tiene un origen mieloide y es considerada el macrófago del SNC (Aguzzi & Zhu, 2017; Sierra et al., 2016). Su distribución y funciones no son homogéneas en el SNC por lo que según la región neuroanatómica la microglía presenta diferente morfología, contenido lisosomal, composición de la membrana y perfil genético (De Biase et al., 2017; Fernandez-Arjona et al., 2017; Lawson et al., 1990).

La microglía cumple múltiples funciones dependiendo de su estado de activación, la causa responsable de su activación y el tipo de estímulos que recibe de su alrededor (Hanisch & Kettenmann, 2007). En condiciones fisiológicas, la microglía participa en el desarrollo del SNC, realiza funciones de homeostasis y está continuamente vigilando el parénquima nervioso a la espera de algún agente o lesión que cause su activación (Boche et al., 2013). Cuando la microglía se activa, gracias a la intervención de receptores y moléculas como los TLR, el sistema del complemento, o citoquinas (Aguzzi & Zhu, 2017), puede llevar a cabo funciones de fagocitosis, presentación de antígenos, remodelación de la matriz extracelular, reparación tisular y modulación de la respuesta inflamatoria (Boche et al., 2013; Hickman et al., 2018; Perdiguero et al., 2015).

Inicialmente se describieron dos tipos de morfología microglial, ramificada e hipertrófica. Actualmente existe un amplio espectro de fenotipos descritos en función de su morfología y de los nuevos análisis de secuenciación. Por el momento, el análisis de esos polimorfismos ha permitido definir las principales morfologías y funciones asociadas a la microglía en las enfermedades neurodegenerativas, siendo las siguientes, las morfologías más observadas (Figura 9) (Boche et al., 2013; Martini et al., 2020; Wyatt-Johnson et al., 2017):

- Ramificada: caracterizada por tener unos procesos muy ramificados y finos para vigilar el parénquima y poder detectar alteraciones debidas a lesiones o agentes patológicos. Anteriormente era conocida como la "microglía en reposo" pero su denominación ha variado ya que, aunque no haya sido activada por algún estímulo, esta microglía nunca está en reposo. De hecho, pese a que su cuerpo celular se mantenga inmóvil, sus prolongaciones están continuamente en movimiento controlando el tejido que le rodea (Nimmerjahn et al., 2005).

- Hipertrófica: posee ramificaciones pero son menos numerosas y más gruesas que la forma ramificada, mientras que su cuerpo celular es mayor de lo normal. Este tipo también es conocido como "microglía activa". Su función se asocia con mecanismos proinflamatorios.

- Ameboide: no tiene prácticamente ramificaciones. Su cuerpo celular es redondeado u oval. Su función se asocia principalmente con procesos de fagocitosis y respuestas proinflamatorias.

- Distrófica: conforme evoluciona este tipo de microglía, su cuerpo celular aumenta de tamaño y sus ramificaciones sufren estrechamientos que hacen parecer que sus procesos están fragmentados. Aunque se ha descrito una baja proporción de este tipo de morfología en casos humanos asociados a la edad avanzada pero sin patología, estudios recientes señalan que su incremento está claramente correlacionado con enfermedades neurodegenerativas como el AD, la demencia con cuerpos de Lewy (DCL), el Huntington (HT), o la esclerosis múltiple (EM) (Bachstetter et al., 2015; Shahidehpour et al., 2021; Streit et al., 2004).

- En bastón: a diferencia del resto de morfologías, esta no tiene un diámetro circular ya que su cuerpo celular es alargado. Posee pequeñas ramificaciones pero predomina una larga que se prolonga de extremo a extremo. Esta morfología fue descrita por primera vez en 1899 por Franz Nissl en la corteza cerebral de pacientes con demencia paralítica. Más tarde se asoció con otras enfermedades neurológicas de origen infeccioso como el tifus o la sífilis, pero el descubrimiento de la penicilina supuso un enorme descenso en la incidencia de estas infecciones y, consecuentemente, las descripciones de este tipo de morfología comenzaron a ser más esporádicas disminuyendo así el interés por conocer sus funciones (Taylor et al., 2014). Sin embargo, en los últimos años, este tipo de microglía se ha descrito en enfermedades neurodegenerativas crónicas como el AD, PD, HT, EM, o trastornos epilépticos, lo que ha hecho resurgir el interés por este tipo de morfología (Au & Ma, 2017; Giordano et al., 2021; Holloway et al., 2019). En todas ellas, la microglía en bastón se ha observado principalmente en la corteza cerebral, en el cerebelo y el hipocampo (Au & Ma, 2017; Bachstetter et al., 2015). Asimismo, su descripción siempre se ha asociado con estructuras neuronales y no con otras células gliales como oligodendrocitos o astrocitos (Taylor et al., 2014; Ziebell et al., 2012). Esta conexión con las neuronas ha llevado a pensar que su principal función es de neuroprotección, participando en la reorganización sináptica tras una lesión moderada (Taylor et al., 2014). Por otro lado, se ha descrito que la estimulación *in vitro* de la microglía en bastón con LPS induce su transformación hacia una microglía con morfología ameboide (Tam & Ma, 2014), un hallazgo que permite explicar por qué no se detecta microglía en bastón cuando la arquitectura tisular está dañada de un modo severo e irreversible.

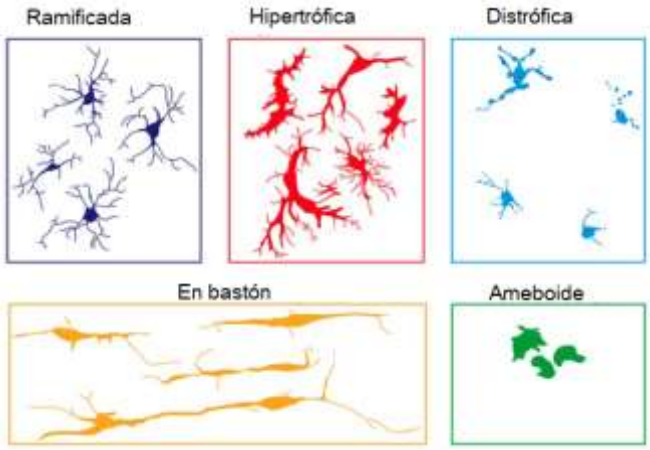


Figura 9. Representación de los principales tipos de morfología microglial asociada a enfermedades neurodegenerativas (Bachstetter et al., 2015).

La activación de la microglía es un proceso clave en las enfermedades neurodegenerativas y, a día de hoy, sigue siendo un tema controvertido porque las funciones que desempeña en la patogénesis de estas enfermedades están relacionadas tanto con efectos beneficiosos como neurotóxicos (Hickman et al., 2018; Peggion et al., 2020). Tradicionalmente se ha asumido que al activarse la microglía podía evolucionar hacia un fenotipo proinflamatorio, asociado con la liberación de citoquinas y mediadores como el TNFα, IL1β, IL6, iNOS, o progresar hacia un fenotipo antiinflamatorio, caracterizado por la liberación de TGFβ, IL10, IL4, entre otras moléculas (Colton & Wilcock, 2010). Sin embargo, actualmente este tipo de clasificación resulta obsoleta ya

que no representa la gran variedad de fenotipos y funciones que se han descrito hasta la fecha (Bachiller et al., 2018). De hecho, en las enfermedades neurodegenerativas podrían coexistir diversos fenotipos con características neuroprotectoras y neurotóxicas (Carroll & Chesebro, 2019).

En las enfermedades priónicas, la microglía es la población celular que más prolifera en el SNC (Asuni et al., 2014). Estudios en los que se han analizado los cambios en la expresión genética a lo largo de la enfermedad han permitido determinar que la activación microglial comienza en las fases preclínicas precediendo a la pérdida neuronal y a la vacuolización (Betmouni et al., 1996; Crespo et al., 2012; Sandberg et al., 2014; Vincenti et al., 2015). Tal y como se ha indicado anteriormente, la microglía parece jugar múltiples papeles en las EET. Por un lado, libera mediadores de la inflamación asociados con efectos proinflamatorios que pueden agravar la neuropatología (Campbell et al., 1993; Kordek et al., 1996; Williams et al., 1994) e induce la diferenciación de los astrocitos hacia un fenotipo neurotóxico (Liddelow et al., 2017). Por otro lado, ejerce un efecto beneficioso gracias a su capacidad para internalizar y degradar la PrP^{Sc} tratando de limitar su acumulación (Gilch et al., 2007; Sinha et al., 2021). Esta doble faceta de la microglía parece que podría depender de la fase clínica de la enfermedad de modo que, en las fases iniciales su función es principalmente neuroprotectora al tratar de degradar la PrP^{Sc}, pero en las fases más avanzadas su función es mayoritariamente neurotóxica pudiendo llegar a fagocitar sinápsis y neuronas totalmente viables (Carroll & Chesebro, 2019; Sinha et al., 2021). No obstante, pese a sus efectos contradictorios, se asume que en general la microglía cumple un papel neuroprotector en las enfermedades priónicas ya que su inhibición reduce el periodo de supervivencia y agrava la neuropatología (Carroll, Race, Williams, Striebel, et al., 2018; Carroll et al., 2020; Zhu et al., 2015).

2.3.4. La astroglía y su respuesta frente al prion.

Los astrocitos, como el resto de las células gliales excepto la microglía, derivan de progenitores neurales de origen ectodérmico (Le Douarin et al., 1991; Rowitch & Kriegstein, 2010). Son las células gliales más abundantes del SNC, constituyendo el 20-40% del total celular (Herculano-Houzel, 2014).

Atendiendo a su morfología y localización los astrocitos fueron inicialmente clasificados en dos grandes grupos: protoplásmicos, ubicados en la sustancia gris y caracterizados por estar muy ramificados; y fibrosos, situados en la sustancia blanca y con procesos más largos pero menos ramificados (Andriezen, 1893; Garcia-Marin et al., 2007). Actualmente su clasificación es mucho más amplia y, al igual que la microglía, su población y sus funciones varían según la región del SNC (Matyash & Kettenmann, 2010; Miller, 2018). Los principales tipos de astrocitos son: astrocitos protoplásmicos, fibrosos, perivasculares, ependimales, glía radial, glía de Bergmann, glía marginal, glía velada y tanicitos (Emsley & Macklis, 2006). Además, se han definido otros dos tipos específicos de la especie humana: astrocitos interlaminares y varicosos (Oberheim et al., 2009).

Los astrocitos no generan potenciales de acción pero son células que pueden excitarse y transmitir señales eléctricas mediante variaciones en la concentración de calcio intracelular y contribuir así en los circuitos neuronales (Shigetomi et al., 2016). Ahora bien, los astrocitos

cumplen muchas otras funciones (Chung et al., 2015; Ferrer, 2017; Hanani & Verkhratsky, 2021; Sofroniew, 2009):

- Participan en el desarrollo del sistema nervioso ya que guían el desarrollo y la migración de los axones y ciertos neuroblastos y están involucrados en la formación de las sinápsis.
- Son esenciales para las sinápsis garantizando un nivel apropiado de fluidos, iones, pH y transmisores sinápticos. También son capaces de liberar transmisores sinápticos para modificar la actividad sináptica neuronal y participan en la fagocitosis de las sinapsis durante los procesos de remodelación neuronal.
- Contactan con vasos sanguíneos y pueden liberar mediadores para controlar el flujo sanguíneo.
- Son fundamentales en el metabolismo del SNC ya que al estar en contacto con los vasos sanguíneos suministran a las neuronas la energía y los metabolitos necesarios. También almacenan glucógeno para aportar la energía necesaria a las neuronas en casos de hipoglucemia o en periodos de alta actividad neuronal.
- Forman parte de la barrera hematoencefálica.
- Regulan el equilibrio iónico extracelular y los niveles de agua.
- Participan en funciones inmunitarias fagocitando y presentando antígenos.

La respuesta astroglial se conoce como astrogliosis reactiva. Este concepto engloba todos aquellos cambios moleculares, celulares y funcionales que tienen lugar como respuesta a una lesión o enfermedad en el SNC. Estos cambios evolucionan gradualmente según la severidad de la lesión comenzando por alteraciones a nivel molecular y morfológico (su cuerpo celular y sus ramificaciones se hipertrofian), y avanzando en los casos graves hasta su proliferación celular. Dicha proliferación puede acabar causando la superposición de las ramificaciones de los astrocitos, fenómeno que en condiciones normales no se produce, y en los casos más severos, la formación de cicatrices gliales (Ferrer, 2017; Sofroniew, 2009). Estos cambios afectan a la funcionalidad normal de los astrocitos y tienen un impacto beneficioso y/o perjudicial sobre las neuronas y el resto de células del SNC (Pekny & Pekna, 2014). Multitud de moléculas pueden desencadenar la astrogliosis como por ejemplo citoquinas, mediadores de la inflamación, ligandos de los TLR y neurotransmisores (Sofroniew, 2009).

La astrogliosis es una característica común en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas como el AD, PD, HT, ELA y las enfermedades priónicas (Aguzzi & Liu, 2017; Phatnani & Maniatis, 2015; Zhou et al., 2019). La activación de los astrocitos puede desencadenar su evolución hacia un fenotipo proinflamatorio, en el que dejan de desarrollar sus funciones fisiológicas y liberan neurotoxinas que causan la muerte de neuronas y oligodendrocitos, o neuroprotector, en el que producen factores neurotróficos que promueven la supervivencia y el crecimiento neuronal (Liddelow et al., 2017). Sin embargo, como sucede con la microglía, es probable que en los astrocitos, además del fenotipo proinflamatorio y neuroprotector, existan otros estados intermedios que coexistan en el SNC durante la neuroinflamación (Liddelow & Barres, 2017).

En las enfermedades priónicas la astrogliosis reactiva es una respuesta ampliamente demostrada por el incremento de la expresión génica y proteica de la proteína acídica fibrilar de la glía (GFAP),

como por la detección de cambios morfológicos asociados a la activación de los astrocitos (Hilton et al., 2013; Lefrancois et al., 1994; Monzon et al., 2018; Sarasa et al., 2012). Sin embargo, y a diferencia de la microglía, la proliferación astroglial en estas enfermedades parece ser minoritaria (Asuni et al., 2014; Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020). Respecto al papel que desempeñan los astrocitos en las enfermedades priónicas, uno de los primeros hallazgos fue su capacidad para sustentar la replicación del prion (Cronier et al., 2004; Raeber et al., 1997). No obstante, su principal función gira entorno a su participación en la neuroinflamación y en la muerte neuronal. De este modo, aunque se ha descrito el incremento de la expresión de genes astrogliales relacionados con efectos antiinflamatorios, la proporción de genes sobreexpresados con efectos proinflamatorios es mayor (Bradford et al., 2021; Hartmann et al., 2019; Makarava et al., 2019; Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020). A su vez, la activación astroglial conlleva la pérdida de sus funciones fisiológicas, lo que agrava más aún la neurodegeneración (Liddelow et al., 2017; Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020). Tal es el efecto de la activación astroglial en las enfermedades priónicas que se ha llegado a correlacionar negativamente el periodo de supervivencia con la cantidad de genes alterados en los astrocitos (Makarava et al., 2021).

Una vez desarrollado el concepto de neuroinflamación y las consecuencias conocidas de la respuesta glial en las enfermedades priónicas, a continuación se realiza una revisión sobre los TLR para contextualizar sus funciones en las enfermedades neurodegenerativas y comprender los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral.

3. Los receptores tipo Toll

El sistema inmunitario de los vertebrados está formado por dos vías, la innata y la adquirida. La respuesta innata es la primera barrera de defensa frente a los microorganismos y está basada en la detección de estructuras moleculares propias de los microrganismos. Dentro de la vía innata, los PRR son fundamentales ya que se encargan del reconocimiento de dichas estructuras. Los PRR están expresados tanto por células inmunitarias como no inmunitarias y agrupan una gran familia de receptores entre los que se encuentran cuatro tipos importantes: los NOD, RIG, CLR y TLR (Kawai & Akira, 2009, 2011; Takeuchi & Akira, 2010). Los TLR son los PRR mejor caracterizados y estudiados en los mamíferos ya que son los principales receptores encargados del reconocimiento de PAMP. Los PAMP son patrones moleculares presentes únicamente en microorganismos pero similares entre ellos al tratarse de moléculas muy conservadas evolutivamente al formar parte de su fisiología primordial. Esta peculiaridad disminuye la probabilidad de que los microorganismos puedan desarrollar mecanismos de evasión de la respuesta inmune pero, al mismo tiempo, impide que estos receptores puedan distinguir entre los microorganismos simbióticos y patógenos, razón por lo cual paralelamente existen mecanismos que regulan su activación. Pero además de reconocer estas moléculas de origen exógeno, los TLR también reconocen moléculas de origen endógeno liberadas al producirse un daño celular en situaciones de trauma, hipoxia, infección o muerte celular, y son los denominados patrones moleculares asociados a peligro (DAMP) (Medzhitov, 2007). Los DAMP tienen diferentes orígenes, desde proteínas intracelulares como proteínas de choque térmico (HSP), histonas y proteínas S100, o proteínas plasmáticas como fibrinógeno, fibronetina y ácido hialurónico (Roh & Sohn, 2018). La identificación de ligandos endógenos ha permitido descubrir que los TLR también están

involucrados en la reparación y regeneración de tejidos o en la respuesta inflamatoria "estéril", como la que se genera en las enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (Venegas & Heneka, 2017; Yang et al., 2018). En los últimos años el estudio de los DAMP ha revelado su implicación en la "hiperinflamación" e inflamación crónica por lo que empiezan a ser considerados como biomarcadores importantes en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades humanas (Fucikova et al., 2015; Land, 2020).

Todas las células del sistema inmune expresan los TLR, incluyendo monocitos/macrófagos, CD, linfocitos T y B y células NK (Liu & Zhao, 2007; Vijay, 2018). También están ampliamente expresados en la mayoría de las células que componen el SNC, como la microglía, astroglía, oligodendrocitos y neuronas (Bsibsi et al., 2002; Trudler et al., 2010), o en otras células no inmunitarias como epiteliales, endoteliales o fibroblastos (Hug et al., 2018; Nagyoszi et al., 2010; Price et al., 2018). Dependiendo de la especie, el tipo de estímulo y el estado de activación de estas células, el número de TLR y sus niveles de expresión varía, por ello prácticamente todos los TLR han sido descritos en las células inmunitarias citadas. No obstante, por la importancia del TLR4 y TLR7 en esta Tesis Doctoral, resulta necesario detallar qué células se asocian principalmente con su expresión. Así, en el caso del TLR4, las células que mayores niveles expresan son la microglía (Lehnardt et al., 2003), las neuronas (Tang et al., 2008), los astrocitos (Gorina et al., 2011), los macrófagos (Stephens et al., 2021) y las CD (Saenz et al., 2014), mientras que en el caso del TLR7 son las CDp (Takagi et al., 2016), ciertos tipos de CD (Bonnardel et al., 2017) y los linfocitos B (Rawlings et al., 2012).

El hecho de que la inflamación sea parte de la respuesta inmunitaria ha impulsado el interés por el estudio de qué células del sistema inmune y por medio de qué receptores se activan las vías de señalización que desencadenan la neuroinflamación. El origen aséptico de la respuesta neuroinflamatoria, junto con la capacidad de los TLR para detectar moléculas de origen endógeno liberadas por el estrés o la muerte celular, ha llevado a considerar a estos receptores como los perfectos candidatos para participar en el desencadenamiento de la respuesta neuroinflamatoria (Kaczmarek et al., 2013; Kakimura et al., 2002). Por ello, antes de profundizar en el papel de los receptores tipo Toll en las enfermedades neurodegenerativas y considerando que dichos receptores son el principal objeto de estudio en la presente Tesis, se hace imprescindible una descripción general de los mismos, que se realiza a continuación.

3.1. Origen, tipos de receptores tipo Toll y sus ligandos.

El primer TLR fue descubierto en *Drosophila melanogaster* en el año 1985 como regulador de la polaridad dorso-ventral durante su desarrollo embriológico (Anderson et al., 1985). Tuvieron que pasar algo más de diez años hasta que se averiguó que este receptor también intervenía en la respuesta inmune frente a infecciones micóticas (Lemaitre et al., 1996) y en 1997 se describió por primera vez un TLR en mamíferos (Medzhitov et al., 1997). A partir de ese momento, numerosas investigaciones comenzaron a asociar estos receptores con la respuesta inmune innata y poco a poco el descubrimiento de sus funciones resultó tan importante que su estudio supuso el premio Nobel en Fisiología y Medicina del año 2011 (Travis, 2011).

Se han descrito 22 tipos de TLR aunque no todos están expresados en todas las especies. En los mamíferos se han identificado 13 tipos del TLR pero no todos son funcionales. Así por ejemplo,

los humanos y las ovejas expresan los TLR 1-10, los ratones los TLR 1-9, 11, 12 y 13, mientras que los peces expresan el TLR22 pero no el TLR6 o TLR11, y las aves expresan el TLR15 y TLR21 pero no el TLR6, 8, 9, 10 u 11. Todos estos receptores surgieron a partir de un único receptor, es decir, un ancestro común, que data de hace aproximadamente 800 millones de años, momento en el que empezaron a surgir por divergencia genética y a evolucionar para especializarse en el reconocimiento de diversas moléculas (Menzies & Ingham, 2006; O'Neill et al., 2013; Turin & Riva, 2008).

Según su localización y el tipo de ligandos que reconocen los TLR se clasifican en dos grupos: los expresados en la membrana citoplasmática (TLR1, 2, 4, 5, 6 y 10), que principalmente reconocen componentes estructurales asociados a patógenos, y los expresados en compartimentos endosomales (TLR3, 7, 8, 9, 11, 12 y 13), que reconocen mayoritariamente ácidos nucleicos de origen vírico, bacteriano o del propio hospedador. Sin embargo, algunos como el TLR1, 2, y 4, pueden variar su localización y una vez activados pueden internalizarse y pasar a formar parte de los fagosomas (Husebye et al., 2006; Underhill et al., 1999).

Los TLR reconocen una amplia gama de moléculas de origen exógeno, tanto vírico, bacteriano, fúngico como parasitario, y de origen endógeno. En la tabla 3 se recogen los principales ligandos asociados a cada TLR (Akira et al., 2006; Takeda & Akira, 2005):

Tabla 3. Principales ligandos de los TLR de origen endógeno y exógeno y su origen.

TLR	**Ligando exógeno**	**Organismo**	**Ligando endógeno**	**Origen**
TLR1	Triacil-lipopéptidos (Pam_3Cys)	Micobacterias		
TLR2	Lipoproteinas Ácido lipoteicoico Peptidoglicanos Lipopolisacáridos Zimosán	Micobacterias Gram + Gram + Gram - Levaduras y hongos	HSP60, 70 HMGB1 Ácido hilurónico Fibronectina Fibrinógeno	Daño celular Daño o muerte celular Matriz extracelular Daño tejidos Inflamación
TLR3	ARN de doble cadena Poli (I:C)	Virus Compuesto sintético	RNA de doble cadena (dsRNA)	Células necróticas
TLR4	Lipopolisacáridos Proteínas de fusión	Gram negativas Virus sincitial respiratorio	HSP60, 70 HMGB1 Ácido hilurónico Fibronectina Fibrinógeno	Daño celular Daño o muerte celular Matriz extracelular Daño tejidos Inflamación
TLR5	Flagelina	Bacterias		
TLR6	Diacil-lipopéptidos (Pam_2Cys) Zimosán	Micobacterias Levaduras y hongos		
TLR7	ARN monocatenario Imidazoquinolinas	Virus Compuesto sintético	ARN moocatenario	Muerte celular
TLR8	ARN monocatenario	Virus		
TLR9	CpG hipometilados	ADN bacteriano y vírico	ADN	Muerte celular
TLR10	Profilina	Protozoos	Desconocido	

3.3. Estructura de los receptores tipo Toll y coreceptores

Estructuralmente los TLR son glicoproteínas transmembrana tipo I con tres dominios (Figura 10): uno extracelular, uno transmembrana y uno citoplasmático. El dominio extracelular es el

encargado de contactar con el ligando y está compuesto por repeticiones de segmentos de 16-28 aminoácidos ricos en leucina (Matsushima et al., 2007). El dominio citoplasmático es el responsable de desencadenar las señales intracelulares y es denominado receptor Toll/IL-1 (TIR) debido a su similitud con el receptor de la IL-1 (O'Neill et al., 2013). Curiosamente, el dominio citoplasmático está bastante conservado entre las especies, mientras que el dominio extracelular es mucho más variable. Esta peculiaridad se cree que se debe a que cada especie evolucionó en un ambiente diferente y tuvo que adaptarse mediante selección natural a las diversas amenazas microbiológicas a las que se veía expuesta desarrollando receptores dirigidos a su reconocimiento (Turin & Riva, 2008; Werling et al., 2006).

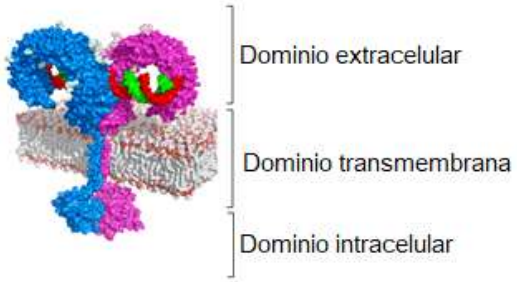


Figura 10. Esquema de la estructura de los TLR (Botos et al., 2011).

De forma general, los TLR en estado inactivo se encuentran en forma monomérica pero la unión con sus agonistas induce su dimerización dando lugar a homodímeros o heterodímeros con una morfología típica en forma de "M". La dimerización permite que los dominios TIR se sitúen más próximos entre sí, interactúen y puedan comenzar el reclutamiento de otras moléculas para activar la señalización intracelular. Sin embargo, el TLR8 y TLR9 son una excepción ya que en su forma inactiva pueden formar dímeros por lo que en este caso es la unión con sus ligandos la que induce un cambio conformacional que finalmente activa la respuesta intracelular (Manavalan et al., 2011). La formación de heterodímeros supone una ventaja porque permite a estos receptores ampliar la gama de ligandos que pueden detectar a pesar de que los mecanismos que posteriormente desencadenan sean prácticamente similares (Farhat et al., 2008). Los heterodímeros más ampliamente estudiados son los formados por el TLR2 al asociarse con el TLR1 o el TLR6, y el constituido por el TLR4 y TLR6 (Akira et al., 2006). Además, en ciertos casos, los TLR pueden cooperar con otros receptores o moléculas accesorias como la proteína de unión de los lipopolisacáridos, una proteína de fase aguda encargada de unirse a los LPS y al ácido lipoteicoico para facilitar su degradación y su presentación a la glicoproteína CD14, o MD2, una proteína que se asociada al dominio extracelular del TLR4 y que es esencial para el reconocimiento de LPS (Di Gioia & Zanoni, 2015; Lee et al., 2012). No obstante, de especial importancia para esta Tesis Doctoral, son CD36 y CD14, dos coreceptores de los TLR capaces de reconocer proteínas malplegadas (Liu et al., 2005; Shmuel-Galia et al., 2017; Stewart et al., 2010).

CD14 es una glicoproteína presente en forma soluble en el torrente sanguíneo o anclada a la membrana celular, capaz de actuar como receptor de multitud de productos microbianos como LPS o peptidoglicanos. CD14 se expresa predominantemente en la superficie de las células de origen mieloide como macrófagos (Sabroe et al., 2002) o microglía (Lehnardt et al., 2003) y realiza dos funciones como coreceptor del TLR4; se encarga de transportar los ligandos que reconoce hacia el TLR4 para facilitar su contacto (Tan et al., 2015) y es esencial para la internalización del

TLR4 mediante endocitosis junto con el ligando reconocido (Zanoni et al., 2011). Pero además de reconocer PAMP, CD14 también reconoce DAMP como el amiloide β, propiedad por la que resulta importante en la activación microglial ya que incrementa su capacidad fagocítica y su respuesta proinflamatoria (Fassbender et al., 2004; Liu et al., 2005; Reed-Geaghan et al., 2009). Además, resulta evidente que CD14 juega un papel clave en las enfermedades neurodegenerativas ya que sus niveles se han detectado aumentados tanto en modelos murinos para el estudio del AD, PD, ELA (Letiembre et al., 2009; Panaro et al., 2008) y scrapie (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018; Saba et al., 2012), como en pacientes con AD (Liu et al., 2005).

CD36 es un PRR clasificado como un receptor scavenger de clase B encargado de reconocer PAMP como componentes bacterianos, fúngicos y parasitarios, actuando solo o como coreceptor del TLR2, TLR4 y TLR6 (Silverstein & Febbraio, 2009). Es un receptor expresado por multitud de células como macrófagos, microglía, astrocitos, neuronas, CD y plaquetas, entre muchas otras (Glezer et al., 2009; Silverstein & Febbraio, 2009). Pero, al igual que CD14, CD36 también reconoce DAMP como lipoproteínas de baja densidad oxidadas (Endemann et al., 1993), restos de células apoptóticas (Ren et al., 1995) péptidos de amiloide β (El Khoury et al., 2003; Jones et al., 2013), α-sinucleína (Su et al., 2008) y fragmentos neurotóxicos derivados del prion ($PrP_{106-126}$) (Kouadir et al., 2012; Kouadir et al., 2011). Respecto a su función como coreceptor de los TLR, se ha demostrado que para la detección de péptidos de amiloide β en cultivos *in vitro* de monocitos y microglía, CD36 induce la formación e internalización del heterodímero TLR4-TLR6 y activa la respuesta proinflamatoria en dichas células caracterizada por el incremento de NO, especies reactivas de oxígeno (ROS) e IL1β (Shmuel-Galia et al., 2017; Stewart et al., 2010).

3.4. Mecanismos de señalización de los receptores tipo Toll

La activación de los TLR comienza con la interacción con su ligando y su dimerización formando homodímeros o heterodímeros. A continuación, los TLR a través de su dominio citoplasmático reclutan una o más proteínas adaptadoras con dominios TIR: la proteína 88 de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MyD88), la proteína adaptadora con dominio TIR (TIRAP), el inductor de interferón-β con dominio TIR (TRIF), la molécula adaptadora relacionada con TRIF (TRAM) o la proteína con dominio armadillo (SARM). De forma genérica, si el TLR activado interactúa con MyD88 se activa la denominada vía MyD88-dependiente, que induce la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB) y que culmina con la producción de citoquinas proinflamatorias (IL2, IL6, IL8, TNFα). Por el contrario, si activa la vía TRIF-dependiente (también llamada MyD88-independiente), se activa el factor regulador de interferón (IRF) que induce la producción de IFN tipo I (α y β). Todos los TLR, a excepción del TLR3, inducen sus señales a través de la proteína adaptadora MyD88, encargada de reclutar a la quinasa asociada al receptor de IL1 tipo 4 (IRAK) hasta el dominio TIR de los TLR. Sin embargo, algunos TLR pueden utilizar ambas vías, la MyD88-dependiente y la MyD88-independiente, como es el caso del TLR4 (Figura 11) (Akira & Takeda, 2004).

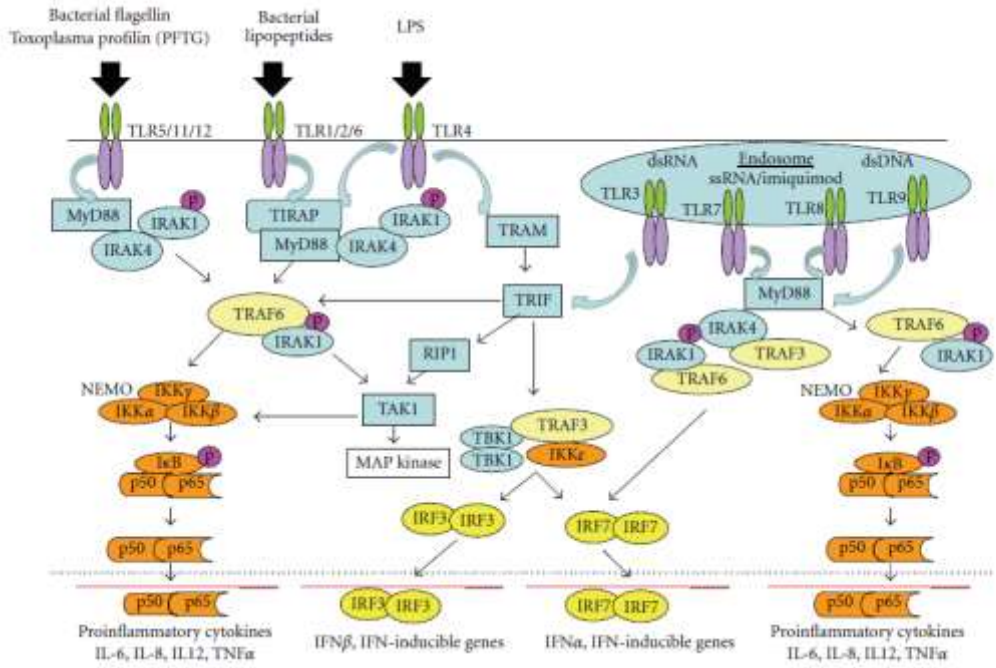


Figura 11. Esquema general de las rutas de señalización de los receptores tipo Toll (TLR) (Zhu & Mohan, 2010).

No obstante, este modelo de señalización no es generalizable y existen particularidades. Así por ejemplo, el TLR1, 2, 4, y 6 requieren a la proteína adaptadora TIRAP para poder atraer a MyD88 hasta la superficie celular y así facilitar su interacción y poder inducir su activación. Por el contrario, otros TLR como el TLR5, 7, 9 y 11, pueden reclutar por sí solos a MyD88. De un modo similar, para que el TLR4 active la producción de IFN por la ruta MyD88-independiente requiere a TRAM, que juega un papel similar a TIRAP actuando como mediador indispensable para que el TLR4 y TRIF puedan interactuar. En cambio el TLR3 solo requiere a TRIF para la activación de la ruta del IFN (Barton & Kagan, 2009).

En el desencadenamiento de la vía MyD88-dependiente participa la familia de las quinasas IRAK, que activan al factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF6) y al factor de crecimiento β asociado a la quinasa 1 (TAK1), que a su vez activan a las quinasas de I kappa B (IKK) o a la quinasa activada por mitógenos (MAP) para inducir finalmente la estimulación de NF-kB o la proteína activadora 1 (AP-1) respectivamente (Akira & Takeda, 2004; Barton & Kagan, 2009).

La activación de la vía TRIF-dependiente a través del TLR3 comienza al interactuar el dominio N-terminal de TRIF con TRAF6 y el C-terminal con la proteína 1 que reconoce el receptor de TNF (RIP1). Para la transcripción de citoquinas inflamatorias, RIP-1 activa a NF-kB a través de TAK1. En cambio, para inducir la producción de IFN I, el TLR3 actúa a través del factor de transcripción IRF3 que es fosforilado y activado por la quinasa de serina/treonina (TBK1) cuyo reclutamiento es facilitado por el factor 3 asociado al receptor del TNF (TRAF3) (Kawasaki & Kawai, 2014; Zhu & Mohan, 2010).

Por otro lado, los receptores endosomales TLR7 y TLR9 pueden inducir tanto la producción de citoquinas inflamatorias, activando NF-κB vía MyD88-dependiente, como la transcripción de IFN I a través del factor de transcripción IRF7 que es fosforilado por IRAK1, IRAK4 o IKKα (Kawasaki & Kawai, 2014; Zhu & Mohan, 2010).

En definitiva, el análisis de las rutas de señalización de los TLR demuestra la complejidad de las interacciones enzimáticas y la importancia de los procesos de fosforilación y ubiquitinización que dichas enzimas llevan a cabo. Como consecuencia, resulta evidente que una de las familias enzimáticas más importantes en estas rutas es la familia de quinasas IRAK dentro de la que se han descrito cuatro tipos en los mamíferos: IRAK1, IRAK2, IRAK4 e IRAKM. No obstante, aunque todas ellas se clasifican como proteínas quinasas serina/treonina, solo IRAK1 e IRAK4 tienen actividad quinasa. Uno de los pasos claves regulados por estas quinasas es la activación de MyD88. Así, al analizar en detalle dicha activación se observa que el proceso conlleva el reclutamiento de IRAK4, encargada a su vez de reclutar a IRAK1 y fosforilarla, dando lugar a un gran complejo denominado "Myddosoma" compuesto por IRAK4, IRAK2 y MyD88 (Lin et al., 2010). Una vez fosforilada IRAK1 es liberada del complejo para unirse a TRAF6 y así continuar la ruta se señalización intracelular que culminará con la activación de los factores de transcripción.

3.5. Funciones de los receptores tipo Toll.

Los TLR están involucrados en multitud de funciones relacionadas principalmente con la respuesta inmune innata ya que están expresados en diversos tipos celulares y además poseen la capacidad para reconocer una gran variabilidad de ligandos. Una de sus funciones más inmediatas tras detectar un PAMP o DAMP, tanto en células del sistema inmune como en el resto, es orquestar la respuesta inmune temprana. De este modo, como consecuencia de su activación, los TLR inducen la producción y liberación de citoquinas, así como la expresión de sus receptores, para atraer a los leucocitos hacia el punto de infección o hacia el tejido lesionado (Iwasaki & Medzhitov, 2004). A su vez, mediante la liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL1β, IL6 y TNFα, también regulan los mecanismos de diapédesis induciendo en las células endoteliales vasculares la expresión de moléculas de adhesión a su superficie, como selectinas e integrinas, para que los leucocitos circulantes en sangre puedan fijarse a ellas y migrar hacia los tejidos periféricos (Khakpour et al., 2015). Pero además, la liberación de IL1β o IL6 también activa a las proteínas de fase aguda y al sistema del complemento cuyo objetivo es opsonizar el patógeno y facilitar su fagocitosis (Medzhitov, 2007).

Por otro lado, la estimulación de los TLR expresados en células del sistema inmunitario como neutrófilos, macrófagos, CD o linfocitos, induce su maduración y la transcripción de genes responsables de la defensa antimicrobiana (Schmitz et al., 2004). En el caso de los macrófagos y las CD, la estimulación de los TLR también activa sus mecanismos de fagocitosis y la maduración de sus fagosomas. Esto último resulta fundamental para que el material fagocitado pueda ser procesado y presentado en su superficie asociado al CMH-II (Blander & Medzhitov, 2004, 2006a).

Pese a ser clasificados como receptores del sistema inmune innato, los TLR juegan un papel muy importante como nexo entre la vía innata y la adquirida. Así, la activación de los TLR en las CPA como las CD, también activa su migración hacia los tejidos y órganos linfoides donde, a través de

su CMH y gracias a la expresión de moléculas como CD40 y CD80/86, presentan los antígenos captados a los linfocitos T y B, desencadenando la respuesta específica (Iwasaki & Medzhitov, 2004; Suresh & Mosser, 2013). Además, los mediadores químicos liberados por esas CPA intervienen en los procesos de diferenciación de los linfocitos CD4+ en sus diferentes subtipos, Th1, Th2 o Th17, o en la activación de los linfocitos T citotóxicos y las NK (Medzhitov, 2007).

Aunque la mayoría de los estudios sobre los TLR están centrados en su papel en la respuesta inmune innata, los TLR también juegan un papel importante y directo en la respuesta inmune específica. De hecho, tanto los linfocitos T como B expresan varios TLR. Entre las funciones que se han descrito en los linfocitos B se sabe que su estimulación aumenta la capacidad de estas células para proliferar, producir anticuerpos y liberar citoquinas (Rawlings et al., 2012). Asimismo, la estimulación del TLR4 de los linfocitos B les permite migrar más rápido hacia los centros germinales de los folículos linfoides para establecer contacto con las CDF (Hwang et al., 2009). En el caso de los linfocitos T, la estimulación de ciertos TLR dirige sus procesos de diferenciación hacia sus diferentes fenotipos, promueve su supervivencia, su proliferación y la producción de citoquinas (Reynolds & Dong, 2013).

3.6. Mecanismos de regulación de los receptores tipo Toll

Los TLR cumplen una labor esencial en la respuesta inmunitaria pero su sobreestimulación o el desarrollo de mutaciones responsables de cambios estructurales y funcionales también están asociados con enfermedades de carácter inflamatorio y autoinmune como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, psoriasis, lupus o incluso cáncer (Achek et al., 2016; Cook et al., 2004). Con el objetivo de prevenir dichos desequilibrios, a continuación se recogen algunas de las estrategias que han desarrollado los TLR para tratar de limitar sus efectos adversos.

Uno de los mecanismos más sencillos para evitar problemas de autoinmunidad es que la mayoría de estos receptores han evolucionado para reconocer moléculas de origen microbiano, que son estructuralmente diferentes a las sintetizadas por los mamíferos. Sin embargo, ciertos TLR como el TLR3, 7, 8 y 9 son capaces de detectar y responder frente al estímulo de ácidos nucleicos, es decir, moléculas que pueden tener un origen patogénico pero que el propio hospedador también puede sintetizar (Akira et al., 2006; Barbalat et al., 2011). En este caso, la ubicación de estos TLR en compartimentos intracelulares es la mejor estrategia para dificultar que entren en contacto en condiciones normales con los ácidos nucleicos del hospedor. Además, son receptores que precisan un proceso de proteólisis complejo para ser plenamente funcionales (Hipp et al., 2013) y esta escisión proteica debe tener lugar en los endosomas en condiciones de pH ácido y por medio de ciertas proteasas como catepsinas y asparagina endopeptidasas (Ewald et al., 2008; Hipp et al., 2013).

Por otro lado, la regulación de la localización de los TLR encargados de la detección de PAMP asociados a bacterias, como por ejemplo el TLR2 y TLR4, también es importante en órganos expuestos a una gran carga bacteriana como por ejemplo el intestino. En este caso, la expresión de los TLR está polarizada, es decir, pueden expresarse en el borde apical o basolateral del epitelio intestinal o incluso internalizarse para evitar un contacto continuado con la flora intestinal

e impedir ser estimulados innecesariamente o de forma prolongada (Abreu, 2010; Otte et al., 2004).

Una vez activados los TLR también existen mecanismos reguladores de las cascadas intracelulares desencadenadas. Este es el caso de la proteína intracelular Tollip, que impide la fosforilación y la activación de la quinasa IRAK1; SARM que inhibe la vía TRIF-dependiente; o el receptor relacionado con la IL-1 de inmunoglobulinas simple que actúa secuestrando a IRAK1 y TRAF6 (Akira & Takeda, 2004; Lang & Mansell, 2007; Sham et al., 2013; Zhang & Ghosh, 2002). Igualmente, se han descrito microRNA (miR) que pueden actuar a diferentes niveles, modificando los niveles de expresión de los TLR, regulando las proteínas y factores de transcripción que se activan en sus cascadas intracelulares o controlando la transcripción de las citoquinas (He et al., 2014).

3.7. Los receptores tipo Toll en las enfermedades neurodegenerativas.

Las enfermedades neurodegenerativas humanas como el AD, PD o HT tienen en común varios aspectos entre los que destacan su incurabilidad, debido a un proceso de degeneración neuronal irreversible, y el acumulo de proteínas con conformación anormal en el SNC, de ahí también su nombre de proteinopatías. En el caso del AD se acumula amiloide β en el compartimento extracelular llegando a formar grandes agregados proteicos denominados placas, mientras que en el compartimento intracelular se acumulan fibrillas de proteína tau hiperfosforilada (Raskin et al., 2015). Las sinucleinopatías, entre las que se encuentra el PD o la DCL, se caracterizan por el acumulo en el interior de las neuronas y células gliales de agredados insolubles de la proteína α-sinucleína, que es el principal componente de los cuerpos de Lewy (Ma et al., 2019; Spillantini et al., 1997). Y en el caso del HT, en el interior de las neuronas se acumula la forma patológica de la proteína huntingtina, generada por una mutación en el gen que la codifica (Arrasate & Finkbeiner, 2012). Pero además, estas enfermedades neurodegenerativas, junto con las enfermedades priónicas, se caracterizan por el desarrollo de una respuesta neuroinflamatoria resultante de la activación del sistema inmunitario de forma crónica y progresiva, que acaba contribuyendo en gran medida al deterioro gradual de las neuronas. De hecho, la activación glial y sus consecuencias parecen seguir también un patrón similar en todas estas enfermedades neurodegenerativas. Así, al igual que se ha explicado en las enfermedades priónicas, en el AD también se ha observado una activación microglial temprana, con efectos predominantemente beneficiosos en las fases preclínicas mediante la fagocitosis de los depósitos de Aβ, pero con efectos mayoritariamente neurotóxicos en las fases más avanzadas debido a la continua liberación de quimiocinas, citoquinas proinflamatorias, radicales libres o especies reactivas de oxígeno, entre otras moléculas que agravan el proceso neurodegenerativo (Hamelin et al., 2016; Hansen et al., 2018; Nordengen et al., 2019; Tiwari et al., 2021).

Actualmente numerosos estudios han demostrado que tanto la expresión génica como proteica de los TLR está alterada en las enfermedades neurodegenerativas, confirmando su participación en la patogenia de estas enfermedades. Tras la revisión de la literatura se presenta en la tabla 4 un resumen con los estudios más relevantes que han mostrado alteraciones de los TLR en enfermedades neurodegenerativas.

Tabla 4. Cambios en los niveles de expresión génica y proteica de los receptores tipo Toll descritos en las enfermedades neurodegenerativas.

	Especie	Expresión en la enfermedad	Alteración de la expresión génica o proteica de los TLR	Referencia
AD	Murina	↑TLR3 y 7	Aumenta la expresión génica del *TLR3* y *7* en la corteza cerebral	(Letiembre et al., 2009)
	Humana	↑TLR2	Localizada la expresión del TLR2 por IHQ en células microgliales alrededor de placas de Aβ	
	Murina	↑TLR2	La inoculación $A\beta_{1-42}$ en el hipocampo de los ratones desencadena a las 6 horas postinoculación la expresión del TLR2 en células microgliales.	(Richard et al., 2008)
	Humana	↑TLR3, 4 y 9	Aumenta la expresión génica *TLR3, 4* y *9* en el cerebro de pacientes con AD. La expresión del TLR3 se colocaliza en células microgliales, astrogliales y células endoteliales en la circunvolución temporal de pacientes con AD	(Walker et al., 2018)
	Murina	↑TLR2, 4, 7, y 9	La expresión génica del *TLR2, 4, 7*, y *9* está aumentada en el encéfalo de un modelo murino para el estudio del AD	(Wirths et al., 2010)
	Murina	↑TLR2, 7 y 13	La expresión génica del *TLR2, 7* y *13* están aumentados en el encéfalo del modelo murino para el estudio del AD	(Liu et al., 2017)
	Murina y humana	↑TLR4	La expresión génica del *TLR4* está aumentada en el encéfalo de un modelo murino para el AD así como los niveles proteicos del TLR4 en casos humanos de AD (correlacionado por IHQ con las placas de β-amiloide)	(Walter et al., 2007)
	Murina	↑TLR2, 4, 5, 7 y 9	La expresión génica del *TLR2, 4, 5, 7* y *9* está aumentada alrededor de las placas de Aβ. Además, alrededor de las placas de Aβ el incremento en los niveles proteicos del TLR2 se colocaliza con las células microgliales	(Frank et al., 2009)
	Humana	↑TLR2 y 4	En el hipocampo la expresión génica del *TLR2* y *4* están aumentadas en casos humanos de AD	(Cribbs et al., 2012)
	Humana	↑TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR8, ↓TLR9	En la corteza temporal de pacientes con AD la expresión génica del *TLR1, 2, 4, 5, 6,* y *8* está aumentada y la del *TLR9* infraexpresada, mientras que en el cerebelo está aumentada la expresión del *TLR1, 4* y *6*	(Chakrabarty et al., 2018)
	Humana	↑TLR1, TLR4, TLR5, TLR7	La expresión génica del *TLR1, 4* y *5* está aumentada en la corteza entorrinal, hipocampo y el giro frontal superior, y la del *TLR7* en la corteza entorrinal e hipocampo de pacientes con AD.	(Herrera-Rivero et al., 2019)
PD	Murina	↑TLR2 y 5	La expresión génica del *TLR2* y *5* está aumentada en el tronco del encéfalo	(Letiembre et al., 2009)
	Murina	↑TLR1, 2, 4, y 8	En la sustancia negra y corteza cerebral la expresión génica del *TLR1, 2, 4,* y *8* está incrementada	(Watson et al., 2012)
	Murina	↑TLR4	En la sustancia negra los niveles proteicos y génicos del TLR4 están aumentados	(Panaro et al., 2008)
	Murina y humano	↑TLR2	La expresión proteica del TLR2 está aumentada en las neuronas piramidales de la neocorteza, astrocitos y microglía	(Kim et al., 2018)
			La expresión proteica del TLR2 está aumentada en las neuronas piramidales de la neocorteza, astrocitos y microglía	
	Humano	↑TLR2	Incrementada la expresión proteica del TLR2 en la sustancia negra pero no en el hipocampo (excepto en CA2)	(Doorn et al., 2014)
LBD	Humano	↑TLR2	La expresión proteica del TLR2 está aumentada y colocalizada con la microglía en la corteza temporal de pacientes humanos con LBD	(Kim et al., 2013)
	Murina	↑TLR2	La expresión proteica del TLR2 está aumentada y se colocalizada con la microglía en el encéfalo murino	(Doorn et al., 2014)

	Especie	Expresión en la enfermedad	Alteración de la expresión génica o proteica de los TLR	Referencia
	Humano	↑TLR2	La expresión proteica del TLR2 está incrementada en la sustancia negra y el hipocampo.	
H	Humano	↑TLR4	La expresión proteica del TLR4 está incrementada en el núcleo estriado	(Vuono et al., 2020)
ELA	Murina	↑TLR1, 2, 7, y 9	La expresión génica *del TLR1, 2, 7*, y *9* en la médula espinal está aumentada	(Letiembre et al., 2009)
	Humano	↑TLR2 y 4	La expresión génica y proteica del TLR2 y 4 está aumentada en la médula espinal.	(Casula et al., 2011)
EM	Murina	↑TLR1, 2, 4, 6, 7, 8 y 9	La expresión génica del *TLR1, 2, 4, 6, 7, 8* y *9* está incrementada en la médula espinal.	(Prinz et al., 2006)
	Humana	↑TLR2, 3 y 4	Los astrocitos aislados de pacientes con EM expresan altos niveles de TLR4 y en menor medida de TLR2 y 3	(Bsibsi et al., 2006)

Resulta complejo especificar qué ligandos son los responsables de la activación de los TLR durante el transcurso de las enfermedades neurodegenrativas ya que son numerosos los DAMP liberados procedentes de las células que mueren o resultan alteradas (Frederiksen et al., 2019). Sin embargo, uno de los descubrimientos más sorprendentes sobre los TLR en estas enfermedades es su capacidad para detectar específicamente el depósito de los agregados proteicos patológicos que las caracterizan. Así por ejemplo, se ha descrito que la estimulación *in vitro* de la microglía con amiloide β (Jana et al., 2008; Stewart et al., 2010; Walter et al., 2007) o α-synucleína (Beraud et al., 2013; Beraud et al., 2011) aumenta la expresión de varios TLR. De hecho, en el caso del TLR2 parece bastante demostrado que actúa como receptor específico de la α-synucleína (Kim et al., 2013; Kim et al., 2018) y del amiloide β (Liu et al., 2012). Este hallazgo es importantísimo e insólito ya que demuestra que los TLR son capaces de detectar y responder frente a proteínas de origen endógeno con estructura anómala activando la respuesta inmune en lugar de mostrar una respuesta de tolerancia inmunológica.

Sin embargo, aunque hoy en día resulta evidente que los TLR juegan dos mecanismos importantes en las enfermedades neurodegenerativas, la unión específica con la proteína patológica y el desencadenamiento de la respuesta inflamatoria, las consecuencias de su estimulación son todavía contradictoras ya que se han descrito efectos tanto neuroprotectores como neurotóxicos (Tabla 5). Esta falta de consenso se debe a la complejidad de los mecanismos que regulan los TLR y la gran cantidad de factores que pueden influenciar sus funciones entre ellos, la fase clínica. Así por ejemplo, entre las múltiples funciones en las que se ven involucrados, los TLR participan en la regulación de la apoptosis, la autofagia, el inflamasoma, la respuesta a proteínas malplegadas relacionada con el retículo endoplasmático o la activación de la fagocitosis microglial y astroglial (Bir et al., 2018; Kim et al., 2018; Lai et al., 2018). Por ello, tratar de categorizar la activación de cada TLR como beneficiosa o perjudicial sin tener en cuenta todos los factores es poco realista. Pero además, para poder entender la función de los TLR es importante tener en cuenta las condiciones experimentales del estudio, ya que no hay que olvidar que existen diferencias en el sistema inmunitario entre especies y, en particular, en el nivel de expresión de los TLR y el tipo de célula que los expresa (Turin & Riva, 2008). Por ello, como señalan Frederiken y colaboradores, el estudio de los TLR en el hospedador natural o en un modelo murino que de forma natural no desarrolla la enfermedad neurodegenerativa y cuya longevidad no es equiparable, puede llevar a resultados muy diferentes (Frederiksen et al., 2019).

Tabla 5. Funciones de los TLR decritas en las enfermedades neurodegenerativas

TLR	*In vivo/ In vitro*	Funciones descritas potencialmente beneficiosas/perjudiciales	Referencia
TLR1	*In vitro,* microglía	La cooperación del TLR1 con el TLR2 para reconocer el Aβ aumenta la respuesta proinflamatoria de la microglía	(Liu et al., 2012)
TLR2	*In vitro,* microglía	La estimulación del TLR2 con ligandos específicos en cultivos microgliales induce su activación, el aumento de la expresión génica de *mFPR2* para mejorar su capacidad de migración ante los estímulos quimiotácticos generados por el Aβ e incrementa la internalización del Ac.	(Chen et al., 2006)
	In vitro, microglía	La estimulación del TLR2 con PGN estimula la internalización de Aβ por parte de la microglía	(Tahara et al., 2006)
	In vivo, ratones	La depleción de la expresión del TLR2 en ratones acelera el cuadro clínico del AD debido a la mayor acumulación de Aβ en el cerebro.	(Richard et al., 2008)
	In vitro, microglía	El TLR2 detecta específicamente la α-syn y su estimulación aumenta su internalización por parte de la microglía	(Kim et al., 2013)
	In vitro, microglía	La estimulación de la microglía con Pam3CysSK4 induce la secreción de TNFα (citoquina proinflamatoria) y en cultivos mixtos con neuronas aumenta la muerte neuronal.	(Rosenberger et al., 2014)
	In vitro, microglía	La estimulación del TLR2 en cultivos microgliales induce la secreción de TNFα e IL1β (citoquinas proinflamatorias) tras su estimulación con $A\beta_{42}$, mientras que la depleción del TLR2 reduce su secreción. Además, la deficiencia del TLR2 en cultivos microgliales hace que internalicen más Aβ y favorece la activación del fenotipo microglial M2 en lugar de M1.	(Liu et al., 2012)
	In vivo, ratones	La deficiencia del TLR2 en las células mieloides favorece la activación de sus fenotipos M2 reduciendo los efectos adversos asociados a los fenotipos M1 y reduce levemente la acumulación de $A\beta_{42}$ en el cerebro al aumentar su fagocitosis.	
	In vivo, Ratones	La administración vía nasal de una molécula que impide la unión del TLR2 y MyD88 bloquea la señalización del TLR2, reduce la activación de la microglía en el hipocampo, disminuye la apoptosis neuronal y mejora la memoria y el aprendizaje de un modelo murino para el AD	(Rangasamy et al., 2018)
	In vivo, ratones	La administración intravenosa de un anticuerpo anti-TLR2 en un modelo murino para el AD reduce la activación de la microglía y astroglía y la cantidad de Aβ en el SNC	(McDonald et al., 2016)
	In vitro, microglía	La estimulación de microglía con α-syn induce el aumento de expresión génica y proteica del TLR2 y aumenta la expresión génica de citoquinas proinflamatorias y quimiocinas.	(Kim et al., 2013)
	In vitro, microglía	La estimulación de microglía con Aβ estimula la expresión del TLR2 e induce la expresión génica de moléculas proinflamatorias (iNOS, TNF-α, IL-1β, IL-6), mientras que la depleción del TLR2 reduce la producción de dichas moléculas.	(Jana et al., 2008)
	In vivo, ratones	La deficiencia de expresión del TLR2 en un modelo murino para el HT aumenta su supervivencia.	(Griffioen et al., 2018)
	In vivo, ratones	La administración de un anticuerpo ani-TLR2 periódicamente reduce la acumulación de α-syn en la neocorteza e hipocampo, la astrogliosis, la microgliosis, los niveles de citoquinas proinflamatorias y la muerte neuronal.	(Kim et al., 2018)
TLR3	*In vitro,* microglía	La estimulación del TLR3 microglial con Poly I:C incrementa la expresión génica de *mFPR2* para mejorar su capacidad de migración ante los estímulos quimiotácticos generados por el Aβ e incrementa la internalización del Aβ	(Chen et al., 2009)
	In vitro, astrocitos	La estimulación del TLR3 en astrocitos extraídos de casos humanos con EM desencadena la liberación de moléculas neuroprotectoras (factores del crecimiento, citoquinas antiinflamatorias, quimiocinas, etc).	(Bsibsi et al., 2006)
	In vivo, ratones	La deficiencia de expresión del TLR3 en un modelo murino para el HT aumenta su supervivencia	Griffioen, K. 2017
TLR4	*In vivo,* ratones	La depleción del TLR4 en un modelo murino de AD causa un mayor acumulo de Aβ en el hipocampo y neocorteza	(Tahara et al., 2006)
	In vitro, microglía	La estimulación del TLR4 con LPS en cultivos microgliales estimula la internalización de $A\beta_{42}$ por parte de la microglía mientras que su depleción disminuye la captación de Aβ	

TLR	*In vivo/ In vitro*	Funciones descritas potencialmente beneficiosas/perjudiciales	Referencia
	In vitro, neuronas	El estímulo de los cultivos neuronales con $A\beta_{1-42}$ incrementa los niveles de expresión del *TLR4* y tiene un efecto pro-apoptótico al inducir también un aumento de la caspasa-3.	(Tang et al., 2008)
	In vitro, microglía	La inhibición del TLR4 en cultivos de microglía estimulados con Aβ impide la producción de citoquinas proinflamatorias y mediadores neurotóxicos que inducen la muerte neuronal.	(Walter et al., 2007)
	In vivo, ratones	La deficiencia de expresión del TLR4 en un modelo murino para el HT aumenta su supervivencia	(Griffioen et al., 2018)
	In vitro, microglia , neuronas y astrocitos	El cultivo mixto de microglía y neuronas estimulado con LPS desencadena la secreción de citoquinas proinflamatorias (TNFα, IL1β e IL6) y fenómenos neurotóxicos que reducen la viabilidad neuronal. Sin embargo, la estimulación de cultivos mixtos de astrocitos y neuronas con LPS no afecta a la viabilidad neuronal.	(De Paola et al., 2012)
	In vivo, ratones	La inhibición del TLR4 con el antagonista VB3323 en un modelo murino para el estudio de la ELA reduce la gliosis y la producción de TNFα	
	In vitro, microglía y neuronas	El cultivo mixto de microglía y neuronas estimulado con LPS induce la muerte neuronal, mientras que el cultivo único de neuronas estimulado con LPS no afecta a su supervivencia	(Lehnardt et al., 2003)
TLR5	*In vitro, microglía*	El ectodominio soluble del TLR5 (sTLR5) se une específicamente al Aβ, facilitando su internalización por parte de la microglía	(Chakrabarty et al., 2018)
	In vivo, ratones	La administración o la expresión del sTLR5 reduce la cantidad de Aβ en el cerebro, tanto de forma preventiva como terapéutica, y reduce los efectos neurotóxicos del Aβ.	
	In vitro, microglia	La continua estimulación del TLR5 con Aβ podría causar una respuesta inmunosupresora limitando el sistema TAM, lo que tendría un efecto negativo en la progresión del Alzheimer	(Herrera-Rivero et al., 2019)
	In vitro, microglía	La estimulación del TLR5 con flagelina en cultivos de microglía desencadena la liberación de moléculas inflamatorias, modula la quimiotaxis, aumenta la fagocitosis pero desencadena la apoptosis neuronal	(Ifuku et al., 2020)
TLR6	*In vitro,* microglía	El $A\beta_{1-42}$ es reconocido por el receptor CD36 que, a través de la formación del heterodímero TLR4-TLR6, induce la secreción de NO, ROS e IL1β y en cultivos mixtos de microglía y neuronas causa la muerte neuronal	(Stewart et al., 2010)
TLR7	*In vitro,* microglía	La estimulación de la microglía con el ligando R837 del TLR7 aumenta su expresión de *mFPR2*, la migración de la microglía hacia el $A\beta_{42}$ y su capacidad para fagocitar los péptidos de $A\beta_{42}$	(Chen et al., 2009)
	In vivo, ratones	La depleción del TLR7 en un modelo murino de AD mejora su aprendizaje espacial pero no altera los depósitos de Aβ ni los niveles de citoquinas	(Liu et al., 2017)
	In vitro, microglía y neuronas	La estimulación del TLR7 con ioxoribine induce la secreción de TNFα y en cultivos mixtos con neuronas causa la muerte neuronal. En cultivos puros neuronales la estimulación del TLR7 también induce la muerte neuronal.	(Rosenberger et al., 2014)
	In vivo, ratones	La inoculación intratecal del ligando específico del TLR7 ioxoribine en ratones causa muerte neuronal por apoptosis a los 3 días post-inoculación.	
	In vitro, microglía y neuronas	La estimulación del TLR7 con el miRNA let-7 aumenta los niveles de TNFα en cultivos microgliales mientras que en cultivos neuronales induce la muerte neuronal por apoptosis	(Lehmann et al., 2012)
	In vivo, ratones	La inoculación del miRNA let-7 intratecal activa al TLR7 e induce un daño axonal y la pérdida neuronal por apoptosis	
TLR9	*In vitro,* microglía	La estimulación del TLR9 con CpG-ODN induce la internalización de $A\beta_{42}$ por parte de la microglía.	(Tahara et al., 2006)
	In vitro, microglía	La estimulación de la microglía con CpG-ODN aumenta la expresión del *TLR9* que a su vez incrementa la expresión génica de *mFPR2* y la internalización de $A\beta_{42}$	(Iribarren et al., 2005)
	In vivo, ratones	La estimulación vía intraperitoneal del TLR9 con CpG-ODN en un modelo murino para el estudio del AD, tanto antes como al inicio de los signos clínicos, disminuye la acumulación de tau y Aβ	(Scholtzova et al., 2014)
	In vitro, microglía	Su estimulación con CpG-ODN induce la secreción de TNFα	(Rosenberger et al., 2014)

Pese a que la variabilidad entre modelos y protocolos de estudio no permiten extraer conclusiones firmes y exclusivas sobre las consecuencias de la activación de los TLR1-10 y cuáles son los más relevantes en las enfermedades neurodegenerativas, en base a los resultados publicados hasta ahora destaca el TLR2, 4 y 9 por su papel en la activación microglial y la inducción de sus mecanismos de fagocitosis, el TLR2, 4 y 7 por su implicación en la apoptosis neuronal y el TLR3 por su función en la activación astroglial (Bir et al., 2018; Kumar, 2019). En contraposición, aunque se han descrito alteraciones en el TLR1, 5, 6, 8 y 10, su implicación en estas enfermedades, según muestra la bibliografía actual, es menor.

3.8. Los receptores tipo Toll en las enfermedades priónicas

Los numerosos estudios publicados sobre los TLR en las enfermedades neurodegenerativas humanas y la constante descripción de nuevos hallazgos contrastan con la escasa literatura sobre el papel de estos receptores en las enfermedades priónicas. A pesar de ello, la detección de alteraciones en los niveles de expresión génica de los TLR en varios modelos murinos evidencia su participación en la patogenia de las enfermedades priónicas a la vez que revela que se trata de un campo todavía sin explorar.

Uno de los primeros estudios en los que se abordó el papel de los TLR en las enfermedades priónicas reveló que la inhibición de la expresión de MyD88, una de las principales proteínas adaptadoras involucrada en los mecanismos de señalización intracelular de los TLR, no tenía consecuencias sobre la patogenia del scrapie en ratones infectados vía intracerebral o intraperitoneal (Prinz, Huber, et al., 2003). Como consecuencia, en un principio los resultados de este estudio indicaron que la replicación y posterior neuroinvasión del prion podía ocurrir sin que los mecanismos de señalización de los TLR por la vía dependiente de MyD88 influyeran en el progreso de la enfermedad (Prinz, Heikenwalder, et al., 2003). Años después, el análisis de la función de IRF3, un factor de transcripción activado en la vía de señalización alternativa a MyD88 mediante la proteína adaptadora TRIF, reveló que la inhibición de IRF3 en ratones infectados con scrapie sí que reducía significativamente su periodo de supervivencia (Ishibashi et al., 2012). Paralelamente, otro estudio demostró mediante técnicas IHQ que los niveles de IRF3 estaban aumentados en el hipocampo y tálamo de ratones infectados con scrapie (Field et al., 2010). De este modo, poco a poco se han ido definiendo las vías de señalización intracelular de los TLR importantes en la patogenia del scrapie. No obstante, recientemente se ha descrito la sobreexpresión génica de *MyD88* en el encéfalo de ratones infectados con scrapie (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018) y mediante transcripción génica masiva se ha detectado el incremento de genes relacionados tanto con la vía dependiente como independiente de MyD88 en ratones (Vincenti et al., 2015). Por ello, a pesar de que inicialmente Prinz y colaboradores describieran que el bloqueo de la vía dependiente de MyD88 no tenía consecuencias en la patogenia del scrapie (Prinz, Heikenwalder, et al., 2003), los resultados genéticos actuales muestran que cuando esta vía está desbloqueada participa en la respuesta inmune inducida por el scrapie. Es decir, los estudios publicados hasta ahora indican que tanto la vía MyD88 dependediente como independiente de señalización de los TLR podrían estar activadas en las enfermedades priónicas.

Por el momento prácticamente la totalidad de los estudios publicados sobre los TLR en las EET han abordado su análisis desde un punto de vista genético usando mayoritariamente modelos murinos o *in vitro*. Así, en el caso del scrapie, se ha demostrado que la inoculación vía intracerebral de ratones con scrapie induce el aumento de la expresión génica del *TLR1, 2* y *7* en el hipocampo y cerebelo (Saba et al., 2012), del *TLR1, 2* y *3* en el tálamo (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018), y del *TLR1-4* y *TLR6-9* al analizar el encéfalo completo (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018). Pese a la importancia de la especie ovina como modelo para el estudio de la infección natural y experimental del scrapie, hasta nuestras investigaciones tan solo había un estudio publicado sobre la participación de los TLR en esta especie(Meling et al., 2018). En dicho estudio se analiza la expresión génica del *TLR2* y *4* en la sangre de corderos VRQ/VRQ inoculados vía oral con scrapie antes de encalostrarse respecto a unos corderos control en diferentes momentos postinoculación (12, 14, 16, 20, 22 y 23 semanas postinoculación). Los resultados de este estudio revelan por primera vez que, tras el inicio de los signos clínicos (a partir de la semana 22 postinoculación), se produce un incremento leve pero estadísticamente significativo del *TLR2* y *4* en la sangre de los corderos infectados con scrapie. Este hallazgo resulta relevante ya que sugiere que podría existir una relación entre la magnitud de la respuesta sistémica durante la fase aguda de la infección y la presentación de los signos clínicos. Sin embargo, pese a la importancia de los TLR en otras enfermedades neurodegenerativas y las evidencias sobre su participación en la patogenia del scrapie en modelos experimentales, por el momento no existe la base bibliográfica suficiente sobre los TLR en casos de animales infectados de forma natural con alguna EET. Asimismo, en la especie humana solo existen dos estudios publicados en los que se ha analizado algún TLR en casos de enfermedades priónicas; el primero describe la sobreexpresión del *TLR4* y *7* en la corteza frontal y cerebelo de pacientes con ECJe y genotipo MM1 y el incremento del *TLR7* en el cerebelo de pacientes con ECJe y genotipo VV2 (Llorens et al., 2014) y el segundo muestra el incremento en la expresión génica del *TLR2* y *9* en la corteza frontal y el cerebelo de pacientes con ECJe (con diferentes genotipos) (Areskeviciute et al., 2020).

A diferencia de otras enfermedades neurodegenerativas en las que parece demostrado que los TLR actúan como receptores específicos de las proteínas anómalas, como por ejemplo el amiloide β y la α-sinucleína, en las enfermedades priónicas no hay estudios que corroboren la interacción entre el prion y estos receptores. No obstante, la estimulación *in vitro* de la microglía con el péptido $PrP_{106-126}$ aumenta la expresión génica y proteica del TLR2 e induce un incremento de iNOS y TNFα, mientras que la inhibición del TLR2 y posterior estimulación con $PrP_{106-126}$ polariza la activación microglial hacia una respuesta antiinflamatoria caracterizada por el aumento de IL10 y TGFβ (Wang et al., 2015). En la misma línea, otro estudio realizado con un cultivo mixto de células gliales y estimulado con fibrillas recombinantes priónicas reveló un incremento de la expresión génica del *TLR1, 2,* y *3* (Kang et al., 2016). Es decir, aunque no existan evidencias claras de que el prion actúe como ligando de los TLR, parece demostrado que los TLR participan en la respuesta inmune que se desarrolla en las enfermedades priónicas.

A pesar de que la expresión génica de varios TLR se ha detectado aumentada en las enfermedades priónicas, se sabe poco sobre su función. Dos estudios demuestran que la inhibición de la expresión del TLR2 o del TLR4 en ratones infectados con scrapie reduce de forma significativa su periodo de supervivencia, sin embargo, la depleción de estos genes no produce

diferencias en los patrones de gliosis, espongiosis o en la cantidad de PrP^{Sc} acumulada en la fase terminal respecto a los ratones que sí expresaban dichos genes (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018; Spinner et al., 2008). Por tanto, la función del TLR2 y TLR4 parece estar relacionada con la velocidad de neuroinvasión. Dado que ambos receptores están claramente descritos en células con capacidad fagocítica, como macrófagos y microglía, ambos estudios sugieren que el efecto observado en el periodo de supervivencia podría estar asociado a la disminución de la capacidad de dichas células para eliminar los depósitos de PrP^{Sc}. Otro de los TLR cuyas funciones han sido mínimamente estudiadas en las enfermedades priónicas ha sido el TLR9. Respecto a este receptor se ha demostrado que su estimulación con agonistas específicos en ratones infectados vía intraperitoneal con scrapie aumenta el periodo de supervivencia (Sethi et al., 2002). Aunque inicialmente no se llegó a identificar cuál era la causa de dicho efecto, ya se planteó la hipótesis de que la activación de las células inmunitarias que expresan el TLR9, como macrófagos y CD, podría explicar este resultado (Sethi et al., 2002). Años después, Spinner y colaboradores apoyaron esa teoría y demostraron que el efecto beneficioso de la administración de agonistas para el TLR9 se debe a la estimulación de la respuesta inmune innata como resultado del incremento en la captación, procesamiento y presentación de antígenos por parte de las CPA y a la inhibicón de los linfocitos Treg (Spinner et al., 2007).

De cualquier modo, aunque los estudios citados han evidenciado que el TLR2, 4 y 9 tienen un efecto beneficioso frente al scrapie, aún hoy se desconocen en gran medida los mecanismos por los cuales esos y el resto de TLR regulan la respuesta inmune en las enfermedades priónicas. Identificar y comprender los mecanismos que controlan los TLR en las enfermedades priónicas es crucial ya que según un estudio de transcriptómica génica el TLR2, TLR4 y MyD88 son algunos de los reguladores transcripcionales más importantes en las enfermedades priónicas (Crespo et al., 2012). Sumado a ello, otro estudio transcritómica publicado muy recientemente afirma que las rutas de señalización de los TLR son una de las principales rutas celulares activadas en casos humanos de ECJe (Areskeviciute et al., 2020). Por todo ello, esta Tesis Doctoral fue diseñada para contribuir en la investigación de los TLR en las enfermedades priónicas utilizando el scrapie como prototipo de enfermedad priónica a través de modelos animales, el ratón y la oveja.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material

Reactivos generales de laboratorio

1. Etanol para biología molecular (Merck)
2. Cloroformo para biología molecular (ThermoFisher Scientific)
3. 2-Mercaptoethanol (Merck)
4. Agua libre ADNasas y RNasas (ThermoFisher Scientific)
5. Etanol (Labbox)
6. Xileno (Labbox)
7. Tampón Tris-borato-EDTA (TBE) (10X) (Fisher Scientific)
8. Agarosa (Merk)

Kits, reactivos específicos y anticuerpos

Histología e inmunohistoquímica

9. StarFrost Slides (FisherScientific)
10. Casetes de histología (FisherScientific)
11. Hematoxilina (Dako)
12. Eosina (Dako)
13. Target retrievel solution, low pH (Dako)
14. Target retrievel solution, high pH (Dako)
15. Wash buffer (10X) (Dako)
16. Antibody diluent (Dako)
17. Peroxidase blocking reagent (Dako)
18. EnVision+ System-HRP Labelled polymer anti-mouse (Dako)
19. EnVision+ System-HRP Labelled polymer anti-rabbit (Dako)
20. EnVision FLEX DAB+ Substrate Chromogen System (Dako)
21. Monoclonal antibody L42 (R-Biopharm, R8005)
22. Monoclonal mouse Anti-human Follicular Dendritic Cell, CNA.42 (Dako, M7157)
23. Glial Fibrillary Acid Protein (Dako, GA524)
24. Anti-Iba1, Rabbit (Wako)
25. TLR4 antibody (NovusBio, NBP2-24538)
26. Anticuerpo anti-TLR7 (Abcam, ab124928)

PCR y qRT-PCR

27. RNAlater (Qiagen)
28. RNeasy Plus Mini Kit (50)(Qiagen)
29. RNase-Free DNase Set (50) (Qiagen)
30. RNeasy Lipid tissue Mini Kit (50) (Qiagen)
31. Turbo DNA-free Kit (Ambion)
32. qScript cDNA SuperMix (Quantabio)
33. RealQ Plus 2x Master Mix Green Low Rox (Ampliqon)
34. Cebadores para RT-PCR (Invitrogen)
35. Speedtools Tissue DNA Extraction kit (Biotools)
36. Taq PCR Core Kit (250 U) (Qiagen)
37. E-Gel Low Range Quantitative DNA Ladder (Invitrogen)

38. Placa de filtración MultiScreen PCR 96 (Merk)
39. Placas FrameStar 96 FastPlate (4titude)
40. GelGreen Nucleic Acid Gel Stain, 10.000X (Biotium)

Western blot

41. Complete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
42. Tampón de extracción y lisis RIPA (ThermoFisher Scientific)
43. Pierce BCA Protein Assay Kit (ThermoFisher Scientific)
44. 20 X XT MES Running buffer (Biorad)
45. 10X Tris Glycine SDS Running Buffer (Biorad)
46. Sodium Dodecyl Sultade (SDS) (Merck)
47. 4-12% Criterion XT Bis-Tris Protein Gel, 18 well, 30 µl (Biorad)
48. 7.5 % Criterion TGX Precast Midi protein Gel, 18 well, 30 µl (Biorad)
49. Trans-Blot Turbo Midi 0.2µm PVDF Transfer Packs (Biorad)
50. Laemmli 2x sample buffer (Biorad)
51. Bovine serum albumin (ThermoFisher)
52. Precision Plus Protein Dual Color Standards (Biorad)
53. Immnobilon Crescendo Western HRP substrate (Merk)
54. Tampón de lavado de inmunotransferencia (Western Blot) Restore (ThermoFisher Scientific)
55. Actin Anticuerpo (H-6) (Santa Cruz Biotechnology, sc-376421)
56. Anticuerpo anti-TLR4 (NovusBio, NBP2-24538)
57. Anticuerpo anti-TLR7 (Abcam, ab124928)
58. Prion protein monoclonal antibody -Sha31 (Bertin Bioreagent, A03213)
59. m-IgGκ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102)
60. Goat anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, 31460)

ELISA

61. HerdCheck BSE-Scrapie Antigen Test kit (IDEXX)

Bioensayos

62. Antibiótico inyectable multiespecie Espes: combinación antibiótica de bencilpenicilina y dehidroestreptomicina.
63. Buprenorfina.

Equipamiento específico empleado para cada técnica

Inclusión de los tejidos

- Procesador de tejidos ASP300S (Leica)
- Centro de inclusión de tejidos (Leica)
- Modulo de placa fría para centro de inclusión (Leica)
- Microtomo de rotación manual (Leica)
- Baño de flotación para cortes de parafina (Electrothermal)

Inmunohistoquímica

- PT Link (Dako): instrumento empleado para el desenmascaramiento de epítopos aplicando calor.

- Microondas: utilizado para el desenmascaramiento de epítopos.
- Autostainer Slide Rack (Dako): este instrumento dispensa de forma automática los reactivos empleados durante la IHQ.
- Sequenza Staining rack immunohistochemestry system (ThermoFisher Scientific): cámara húmeda con diseño vertical empleada para la realización de inmunohistoquímica de forma manual.

Western blot

- TeSeE PRECESS 48 Homogenizer (Biorad): homogeneizador de tejidos usado para triturar los tejidos.
- Lector de placas multimodo (BMG Labtech):utilizado para la determinación de la concentración proteica.
- Multi-Block-Heater 2002 (Lab-Line)
- Criterion Cell (Biorad): cubeta de electroforesis vertical para geles de tamaño Midi empleada para la separación de las proteínas según su tamaño en un campo eléctrico.
- Trans-blot Turbo Transfer System (Biorad): empleado para la fase de transferencia de las proteínas.
- UVP BioSpectrum 815 Imaging System: analizador de imagen utilizado para revelar las membranas de WB.

PCR y RT-PCR

- Ultra Turrax T25 (IKA): homogeneizador de tejidos usado para triturar las muestras.
- NanoDrop 1000 Spectrophotometer (ThermoFisher Scientific): empleado para la determinación de la calidad del ARN y su concentración.
- 2720 Thermal cycler (Applied Biosystems): utilizado para la amplificación del ADN en PCR convencional y la retrotranscripción del ARN en ADN complementario.
- Cubeta de electroforesis (Cultex): empleada para la separación de los fragmentos de ADN según su tamaño aplicando un campo eléctrico.
- Fuente de alimentación para electroforesis (Apelex).
- Millipore colector en vacío Multiscreen (Merck): sistema de filtración al vacío utilizado para placas de filtro.
- Bomba de presión y vacío (Merck).
- QuantaStudio 3 qPCR (Applied Biosystems).
- Centrifuga (Kubota 3500)

ELISA

- Multi-Mode Washer Dispenser ELx50 (BioTek): sistema de lavado automático para placas de ELISA.
- Lector de absorbancia para microplacas Sunrise (Tecan): para el análisis fotométrico de placas de 96 pocillos de ensayos de ELISA.
- Agitador digital de microtitulación MTS 2/4 (IKA): agitador de placas
- Homogeneizador PrioGENIZER (Prionics): para homogeneizar las muestras de encéfalos.

Métodos

1. Análisis histopatológico e inmunohistoquímico.

1.1. Conservación de los tejidos: fijación, tallado, inclusión en parafina y corte en el micrótomo.

Para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico, los tejidos recogidos durante las necropsias fueron preservados en formaldehído tamponado al 10% durante 48 horas. Pasado ese tiempo, las muestras se tallaron en una campana de bioseguridad seleccionando las áreas de interés y fueron guardadas en casetes sumergidas en formaldehído al 10% otras 24 horas. A continuación, para la inclusión de las muestras en parafina se empleó un procesador de tejidos automático que deshidrata las muestras sometiéndolas a concentraciones crecientes de etanol, después las transfiere a una solución de xileno y finalmente las pasa a la parafina líquida. Una vez embebidas las muestras en parafina líquida, se montaron en unos moldes de metal en un centro de inclusión de tejidos y se dejaron solidificar colocando los bloques sobre una placa fría. Después, los bloques se cortaron en láminas de 3-4 µm de grosor utilizando un micrótomo y se depositaron las láminas en un baño termostático a aproximadamente 45ºC para recogerlas con portaobjetos tratados con xilol (starfrost). Finalmente, los portaobjetos se dejaron secar en una estufa a 37ºC durante 24 horas.

1.2. Tinción con hematoxilina-eosina.

La técnica de tinción con hematoxilina eosina es una prueba de rutina en la anatomía patológica que permite evaluar de un modo sencillo la estructura celular y tisular. Esta técnica se empleó para la valoración de la espongiosis en el SNC de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y los ratones inoculados vía intracerebral con scrapie, así como para el examen del íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y de las ovejas adultas, corderos y ratones inoculados vía oral.

Para la realización de esta tinción, primero se desparafinaron las muestras en xilol y se rehidrataron mediante inmersión en concentraciones decrecientes de alcohol y finalmente en agua. El protocolo seguido fue el siguiente:

- Xilol: 4 min (x2)
- Alcohol 100%: 4 min (x2)
- Alcohol 96%: 1 min
- Alcohol 70%: 1 min
- Agua corriente: 5 min

A continuación las muestras fueron teñidas con hematoxilina (sumergiéndolas durante 5 minutos) y tras un lavado de 1 minuto en agua corriente, se incubaron en alcohol ácido (ácido acético al 1% en alcohol al 70%) durante 2 minutos y se tiñeron con eosina (sumergiéndolas 2 minutos). Finalmente, las muestras fueron deshidratadas y montadas siguiendo el siguiente procedimiento:

- Deshidratar las muestras:
    - Alcohol 70%: inmersión (x3)

- Alcohol 96%: inmersión (x3)
- Alcohol 100%: inmersión (x3)
- Alcohol 100%: inmersión (x3)
- Xilol: inmersión (x3)
- Xilol: inmersión 5 min

- Montar las muestras en Dibutylphtalate Poliestireno Xileno (DPX)

Para la valoración de los niveles de espongiosis en el SNC, se siguieron los criterios publicados por otros autores (Ligios et al., 2002). De este modo, se asignó el valor 0 a aquellas muestras que no presentaban ningún signo de lesión y el valor 5 a aquellas que presentaban un nivel máximo (Figura 12).

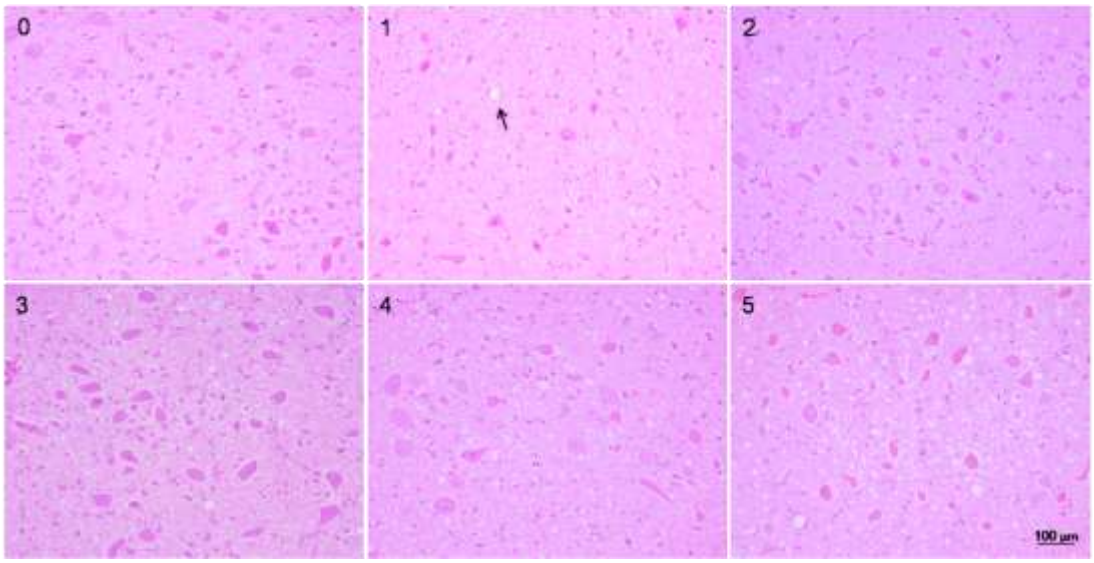


Figura 12. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para valorar la espongiosis: de 0 (no hay vacuolas) a 5 (abundantes vacuolas) a partir de muestras teñidas con hematoxilina-eosina en diferentes fases clínicas.

1.3. Técnicas inmunohistoquímicas.

La inmunohistoquímica permite detección de una proteína específica en tejidos orgánicos mediante el uso de anticuerpos diseñados para el reconocimiento de epítopos presentes en dicha proteína. Los anticuerpos primarios empleados en esta tesis son tanto monoclonales como policlonales ya que fueron seleccionados según su diseño específico para la especie ovina o la existencia de publicaciones previas que garantizaran su funcionamiento en dicha especie. Por otro lado, todos los protocolos inmunohistoquímicos aplicados están basados en el método indirecto para la detección de la unión del anticuerpo primario con el epítopo. Como consecuencia, según la especie en la que estaba diseñado el anticuerpo primario (ratón o conejo) se empleó un anticuerpo secundario específico ("anti-mouse" o "anti-rabbit") conjugado con la enzima peroxidasa (HRP) que al entrar en contacto con su sustrato, el peróxido de hidrógeno, produce una reacción que oxida el cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Esta reacción origina un producto de color marrón, insoluble en alcohol y otros solventes orgánicos, que permite su visualización en un microscopio óptico. Debido a la utilización del cromógeno DAB para la coloración de las muestras, fue necesario bloquear la peroxidasa endógena que normalmente se

encuentra en los tejidos para evitar señales inespecíficas. Para ello, antes o después de la incubación con el anticuerpo primario, se empleó una solución diseñada para el bloqueo de la peroxidasa endógena.

Para llevar a cabo esta técnica, es necesario realizar un procedimiento conocido como recuperación antigenética o desenmascaramiento de epítopos ya que la fijación de los tejidos usando formaldehído y su posterior inclusión en parafina causa modificaciones en las proteínas (antígenos) que pueden impedir su unión con el anticuerpo. Para revertir este efecto y recuperar la inmunoreactividad de los antígenos se pueden llevar a cabo dos métodos: enzimáticos o térmicos (aplicando calor). El uso de un método u otro, o ambos, depende de diversos factores por lo que requiere la puesta a punto del protocolo para cada anticuerpo. Por ello, todos los protocolos inmunohistoquímicos llevados a cabo en esta tesis, a excepción de la detección de la GFAP, han requerido el desenmascaramiento de epítopos por calor. Por regla general, para los tejidos de origen ovino el protocolo seleccionado en el PT Link fue de 96ºC durante 20 minutos y en el caso de los tejidos murinos de 96ºC durante 10 minutos, habiendo siempre precalentado el buffer de recuperación a 85ºC. Por el contrario, solo el protocolo para la detección de la PrP^{Sc} requirió el tratamiento enzimático con PK.

A continuación se detallan los protocolos empleados para cada uno de los anticuerpos empleados en esta tesis.

1.3.1. Protocolo para la detección de PrP^{Sc} en muestras ovinas y murinas.

La PrP^{Sc}, a diferencia de la PrP^{c}, es parcialmente resistente a la digestión con PK. Gracias a esta diferencia bioquímica puede detectarse de forma específica la PrP^{Sc} mediante técnicas IHQ.

El anticuerpo policlonal L42 (R-Biopharm) es un anticuerpo monoclonal diseñado en la especie murina que reconoce el epítopo globular comprendido entre los aminoácidos 145 y 163 (GNDYEDRYYRENMYRYNQ) de la secuencia aminoacídica de la PrP ovina. Este anticuerpo presenta una reactividad cruzada con las secuencias aminoacídicasde la PrP de otros rumiantes y otras especies como cerdos, perros, gatos, humanos, visones y conejos (Harmeyer et al., 1998). El anticuerpo L42 reconoce los depósitos de PrP^{Sc} extracelular e intracelular, propiedad que los anticuerpos diseñados para el reconocimiento de epítopos localizados en el extremo N-terminal de la proteína PrP no poseen (Jeffrey & Gonzalez, 2007).

El anticuerpo pooliclonal R486 diseñado en conejo reconoce la secuencia aminoacídica de la PrP ovina comprendida entre los aminoácidos 240-254 (SPPVILLISFLIFLI) aunque también detecta la PrP bovina y murina (Aguilar-Calvo et al., 2017; Gonzalez et al., 2003). Este anticuerpo fue elegido para la detección de la PrP^{Sc} en muestras murinas ya que, a diferencia de otros anticuerpos probados, las inespecificidades detectadas en el SNC de los ratones transgénicos tg338 asociadas a la sobreexpresión de la PrP^{C} ovina eran significativamente menores. Este anticuerpo no está disponible de forma comercial y fue donado por R. Jackman.

Para la detección de la PrP^{Sc}, tras desparafinar las muestras (siguiendo el mismo protocolo que anteriormente se ha explicado), se realizó un desenmascaramiento de epítopos enzimático y

térmico. Para ello, las muestras se sumergieron en ácido fórmico (98%) durante 15 minutos con un doble propósito; favorecer el desenmascaramiento de los epítopos y reducir la infectividad de las muestras. Tras lavarlas con agua corriente durante 10 minutos y pasarlas a agua destilada, las muestras se incubaron en una solución de PK a 4µg/ml (en buffer PK) durante 15 minutos a 37ºC. A continuación se realizó el desenmascaramiento térmico de epítopos incubando las secciones en Target retrievel solution (low pH) (Dako) a 96ºC durante 20 minutos en el caso de las muestras ovinas y durante 10 minutos en el caso de las muestras murinas usando el PT Link. Seguidamente, las preparaciones se transfirieron a Wash Buffer (Dako) durante un mínimo de 20 minutos.

Para la inmunodetección se usó el Autostainer Slide Rack con las muestras ovinas y el Sequenza Staining rack immunohistochemestry system con las muestras murinas para poder realizar la incubación con el anticuerpo primario durante varias horas en una cámara húmeda. Una vez colocados los portaobjetos en cada sistema, se bloqueó la peroxidasa endógena con Peroxidase blocking solution (Dako) durante 5 minutos y tras los lavados con Wash Buffer, las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario; en el caso de las muestras ovinas con el L42 diluido a 1:500 durante 30 minutos y en las murinas con el anticuerpo R486 diluido a 1:8000 overnight a 4ºC. A continuación, las muestras se lavaron con Wash Buffer y se incubaron con el anticuerpo secundario; EnVision+ System-HRP Labelled polymer anti-mouse (Dako) para las muestras ovinas y EnVision+ System-HRP Labelled polymer anti-rabbit (Dako) para las muestras murinas durante 30 minutos. Tras lavar de nuevo las muestras con Wash Buffer, se revelaron cubriéndolas con el EnVision FLEX DAB+ (Dako) durante 5 minutos. Finalmente, se contratiñeron incubándolas en hematoxilina durante 5 minutos, se lavaron y se procedió a su deshidratación y montaje (siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente).

La valoración semicuantitativa de los depósitos de PrP^{Sc} en el SNC de las ovejas y de los ratones tg338 se realizó de forma semicuantitativa de 0 (no hay tinción) a 5 (tinción intensa y uniforme) a partir de protocolos ya publicados (Figura 13) (Jeffrey, Martin, Gonzalez, et al., 2001).

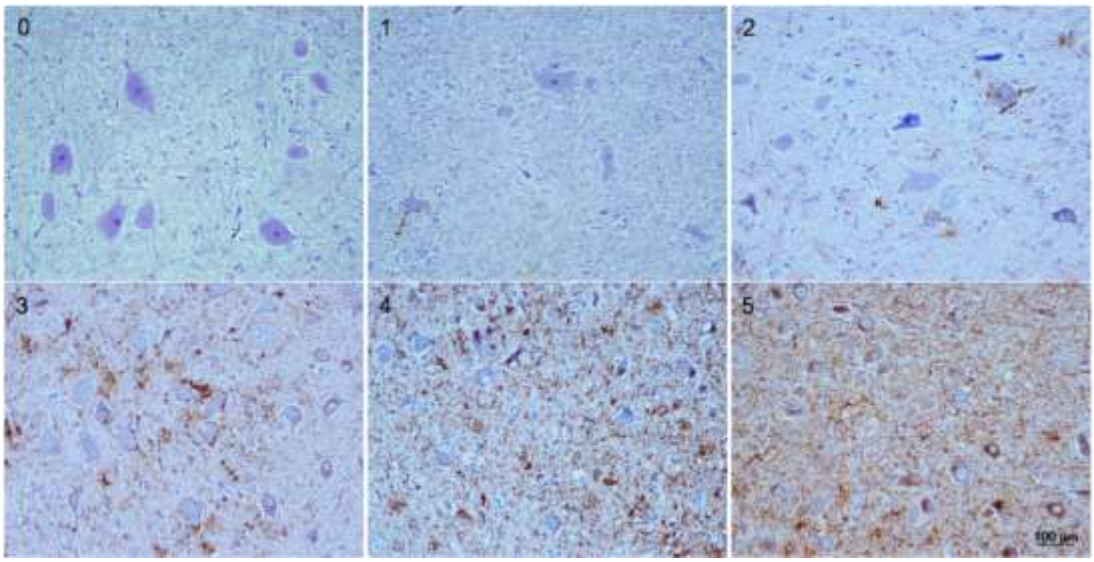


Figura 13. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para establecer la cantidad de los depósitos de PrP^{Sc} de 0 (no hay tinción) a 5 (tinción intensa y uniforme). Las imágenes corresponden a depósitos de PrP^{Sc} detectados con el anticuerpo L42 (R-biopharm) en la médula oblongada de ovejas infectadas de forma natural con scrapie en diferentes fases clínicas.

La determinación de los tipos de depósitos de PrP^{Sc} en el SNC de las ovejas se llevó a cabo atendiendo a protocolos previamente publicados (Jeffrey & Gonzalez, 2007). De este modo, los depósitos intracelulares fueron clasificados como intraneuronales o intragliales, y los extracelulares como asociados al neuropilo o asociados a células gliales. Paralelamente, la magnitud de dichos depósitos se evaluó como 0 (ausencia), 1 (leve), 2 (moderada) y 3 (severa).

La valoración semicuantitativa de la PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie, se evaluó de forma semicuantitativa con el programa de análisis de imagen ImageJ siguiendo un método previamente publicado (Crowe & Yue, 2019). Se tomaron tres imágenes de las zonas más representativas a valorar de cada animal y se ajustaron los valores de intensidad y contraste de igual manera en todas las imágenes. A continuación se seleccionó la opción "Deconvolution" y el vector "H DAB" (para muestras reveladas con DAB y contrateñidas con hematoxilina). Se seleccionó el panel que mostraba la tinción del DAB y se eliminó la señal de fondo ajustando el valor máximo del "Threshold". Una vez determinado un valor óptimo para el threshold máximo, se aplicó el mismo valor para todas las imágenes a comparar. De este modo el programa convierte la imagen a evaluar en una imagen en blanco y negro y transforma el valor máximo de threshold en 255 (siendo cero el negro y 255 blanco). Para analizar la señal del DAB, se tuvo en cuenta el tamaño del folículo linfoide a evaluar. Así, la señal del DAB se evaluó en proporción a la región de interés (ROI) equivalente a cada folículo linfoide. De cada animal se analizaron tres folículos linfoides.

1.3.2. Protocolo para la detección de Iba1 y GFAP en el encéfalo de ovejas y ratones.

Para el inmunomarcaje de la microglía existen numerosos marcadores celulares como TMEM119, MHC-II, CD68, o la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado (Iba1). Este último es uno de los marcadores microgliales más utilizados ya que, a diferencia del resto, detecta la microglía en cualquier estado de activación y permite evaluar su morfología. Sin embargo, el uso de Iba1 no permite distinguir entre los diferentes fenotipos funcionales de la microglía (Ito et al., 1998; Lier et al., 2021).

La GFAP es una de las proteínas que constituyen los filamentos intermedios del citoesqueleto de los astrocitos y es el marcador inmunohistoquímico más comúnmente empleado para la identificación de dichas células. Sin embargo, este marcador astroglial tiene ciertas limitaciones ya que la GFAP es expresada por la mayoría de los astrocitos reactivos pero en condiciones normales no todos los astrocitos la expresan. Además, la GFAP no se expresa por todo el citoplasma, solo en las ramificaciones principales, por lo que la detección de las prolongaciones más finas de los astrocitos es escasa. Por ello, el estudio de la GFAP puede infraestimar las ramificaciones y la superficie ocupada por los astrocitos (Kimelberg, 2004; Sofroniew, 2009).

Para la detección de Iba1, tras desparafinar las muestras (siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente), se realizó el desenmascaramiento térmico de epítopos con la solución Target retrievel solution (low pH) a 96ºC durante 20 minutos en las muestras ovinas y 10 minutos en las muestras murinas. En cambio, para la detección de GFAP no fue necesario el desenmascaramiento térmico de epítopos. Tras sumergir las muestras durante mínimo 20 minutos en Wash Buffer, se colocaron en el sistema Sequenza Staining rack immunohistochemestry para bloquear la

peroxisasa endógena incubándolas durante 10 minutos con Peroxidase blocking solution. Tras lavar las muestras, la inmunodetección de GFAP (Dako) se realizó incubando las muestras con el anticuerpo primario diluido a 1:500 durante 30 minutos. Para la inmunodetección de Iba1 (Wako), las muestras se incubaron durante toda la noche a 4ºC con el anticuerpo primario diluido a 1:1000. A continuación, las muestras fueron lavadas y se incubaron con el anticuerpo secundario EnVision+ System-HRP Labelled polymer anti-rabbit durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las muestras se volvieron a lavar y se revelaron cubriéndolas con EnVision FLEX DAB+ durante 5 minutos. Por último, se contratiñeron con hematoxilina durante 5 minutos, se lavaron con agua destilada y se deshidrataron y montaron (siguiendo el protocolo explicado anteriormente).

Los resultados inmunohistoquímicos de Iba1 fueron evaluados semicuantitativamente de 0 (tinción leve y pocos cuerpos celulares marcados) a 5 (tinción muy intensa debido al aumento en el número de cuerpos celulares marcados) (Figura 14).

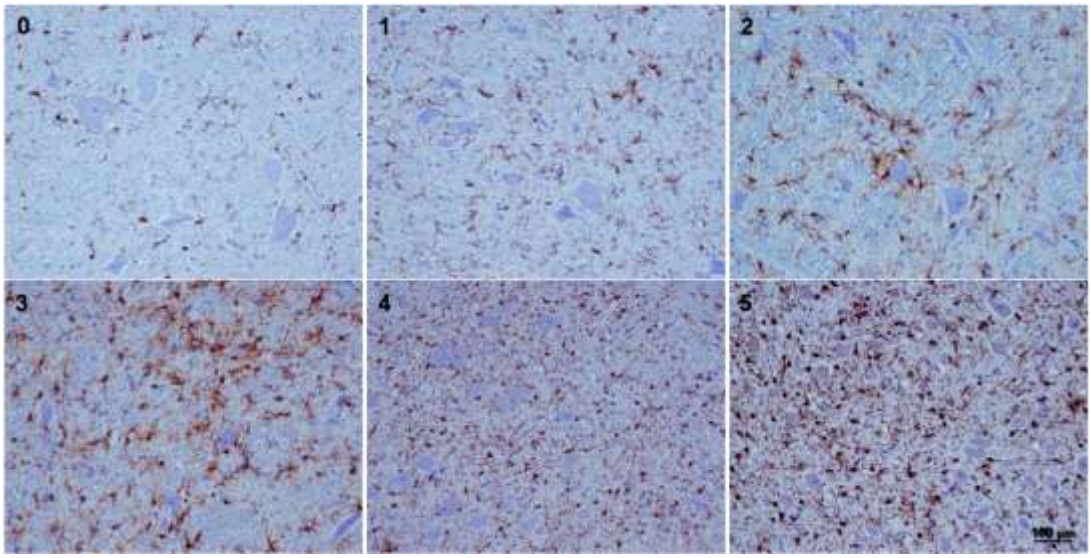


Figura 14. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para establecer la intensidad de la microgliosis: de 0 (leve) a 5 (tinción muy intensa y uniforme debido al incremento en el número de células microgliales). Las imágenes corresponden a la microgliosis detectada con el anticuerpo Iba1 (Wako) en la médula oblongada de ovejas infectadas de forma natural con scrapie en diferentes fases clínicas.

Los resultados inmunohistoquímicos de la GFAP fueron evaluados semicuantitativamente de 0 (tinción leve) a 5 (tinción muy intensa debido al incremento en el tamaño del cuerpo de los astrocitos y al engrosamiento de sus ramificaciones) (Figura 15).

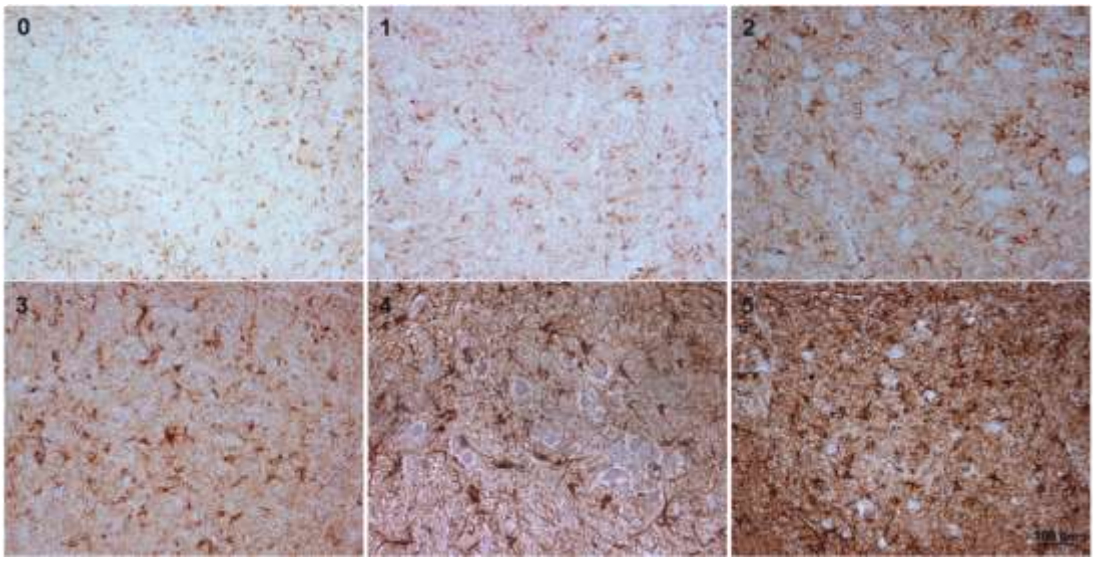


Figura 15. Sistema de valoración semicuantitativa utilizado para establecer la intensidad de la astrogliosis de 0 (leve) a 5 (tinción muy intensa debido al aumento del tamaño del cuerpo celular de los astrocitos y al engrosamiento de sus ramificaciones). Las imágenes corresponden a la astrogliosis detectada con el anticuerpo GFAP (Dako) en la médula oblongada de ovejas infectadas de forma natural con scrapie en diferentes fases clínicas.

1.3.3. Protocolo para la detección de macrófagos, células dendríticas foliculares, TLR4 y TLR7 en el íleon de ovejas y corderos.

Para el inmunomarcaje de macrófagos se empleó un anticuerpo policlonal para la detección de Iba1 (Wako), una proteína expresada específicamente por macrófagos y microglía (Mikkelsen et al., 2017; Ohsawa et al., 2000). Para la detección de las células dendríticas foliculares se utilizó el anticuerpo monoclonal CNA.42 (Dako) que detecta un antígeno expresado en la superficie celular de sus dendritas y que previamente había sido utilizado en la especie ovina (Melzi et al., 2018; Romero-Palomo et al., 2013; Ruiz-Campillo et al., 2020). Por último, para la detección de la expresión del TLR4 y TLR7, ya que hasta la fecha no hay comercializados anticuerpos para la especie ovina, se analizaron *in silico* diferentes anticuerpos comerciales para comparar el porcentaje de similitud entre la secuencia aminoacídica del epítopo que reconocían y la proteína ovina. Finalmente, se optó por un anticuerpo policlonal para la detección del TLR4 (NovusBio), diseñado para la detección de un epítopo localizado en el segmento aminoacídico 650-700 de la proteína humana y que está validado para la especie bovina, y un anticuerpo monoclonal para la detección del TLR7 (Abcam) diseñado para la especie humana. Utilizando la herramienta bioinformática de búsqueda de alineamiento local básico (BLAST) para alinear dos secuencias proteicas, se analizó el porcentaje de similitud entre el segmento aminoacídico 650-700 del TLR4 humano (NP_001129402.1) con la secuencia aminoacídica del TLR4 ovino (NP_001129402.1) y resultó ser de un 97%, es decir, el anticuerpo muy probablemente reconocería también el TLR4 ovino. En el caso del TLR7 la secuencia aminoácidica que detecta no está disponible pero la empresa que lo comerzializa analizó el porcentaje de similitud entre el epítopo para el que está diseñado el anticuerpo y la secuencia de la proteína ovina y garantizó que el porcentaje de similitud era mayor al 90%.

Para el análisis IHQ, tras desparafinar las muestras, se procedió al desenmascaramiento térmico de epítopos. Para el inmunomarcaje de las CDF, el desenmascaramiento térmico de epítopos se

realizó en microondas durante 15 minutos sumergiendo las muestras en la solución Target retrievel solution (high pH) (Dako) previamente precalentada a 85ºC. Para el inmunomarcaje del Iba1 y el TLR4 el proceso se llevó a cabo en el PT Link sumergiendo las muestras durante 20 minutos a 95ºC en la solución Target retrievel solution (low pH) mientras que para el TLR7 se utilizó la solución Target retrievel solution (high pH) (Dako. A continuación, las muestras se incubaron en Wash Buffer durante 20 minutos a temperatura ambiente. Para evitar inespecificiadades con el anticuerpo secundario, las muestras fueron bloqueadas con suero de cabra al 10% en PBST durante 1 hora. En este caso, como la incubación de todos los anticuerpos primarios fue realizada durante toda la noche a 4ºC, para la inmunodetección se utilizó el sistema Sequenza Staining rack immunohistochemestry. Antes de dispensar los anticuerpos primarios, la peroxidasa endógena fue bloqueada con Peroxidase blocking solution durante 15 minuntos. Tras lavar las muestras con Wash Buffer, se incubaron con los anticuerpos primarios a 1:25 para CNA.42, 1:1000 para Iba1, 1:1000 para el TLR4 y 1:100 para el TLR7. A continuación, se lavaron las muestras con Wash Buffer y se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario; EnVision System-HRP Anti-mouse para el anticuerpo anti-CNA.42 y EnVision System-HRP Anti-rabbit para el anticuerpo anti-Iba1, anti-TLR4 y anti-TLR7. Para el revelado se cubrieron las muestras con EnVision FLEX DAB+ durante 5 minutos. Por último, las muestras se contratiñeron con hematoxilina durante 5 minutos y, tras lavarlas con agua destilada, se procedió al deshidratado y montaje (siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente).

La valoración del inmunomarcaje generado por los anticuerpos anti-CNA.42, anti-Iba1 y anti-TLR7 se realizó con el programa de análisis de imagen ImageJ siguiendo el mismo protocolo explicado anteriormente para el análisis de la PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas.

2. Determinación del genotipo ovino para el gen *Prnp.*

2.1. Extracción de ADN a partir de muestras de sangre.

Para la extracción del ADN se utilizó el kit Speedtools tissue DNA extraction (Biotools) diseñado para la extracción y purificación de ADN genómico a partir de tejidos, células, bacterias, hongos y fluidos orgánicos. En nuestro caso, el protocolo empleado fue el especificado por el kit para la extracción de ADN a partir de muestras de sangre que a continuación se detalla brevemente.

Antes de extraer el ADN, las células presentes en la muestra de sangre fueron lisadas incubando durante 10 minutos a 70ºC en un termoblock la mezcla constituida por: 200 µl de la sangre, 25 µl de PK y 200 µl del buffer BB3. A continuación, se añadieron 210 µl de etanol al 100% y se transfirió todo el volumen a una columna suministrada por el kit. Mediante centrifugación, la mezcla pasa a través de la membrana de la columna quedando el ADN retenido en ella. Tras dos lavados con el buffer BBW y BB5, el ADN se recogió realizando una elución final con 100 µl del buffer BBE. El filtrado obtenido se conservó a -20ºC hasta su amplificación mediante PCR.

2.2. Amplificación del gen *Prnp* mediante PCR convencional y purificación para su secuenciación.

Para la amplificación de la secuencia ORF del gen *Prnp* localizado en el cromosoma 13 de la oveja se utilizó la técnica de PCR convencional usando el kit Taq PCR Core (Qiagen). Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de PCR de 0.2 ml y el protocolo empleado fue el siguiente:

Componentes de la mezcla para la reacción y PCR

Para obtener un volumen final de 50 µl la mezcla para la reacción se detalla a continuación:

Reactivo	Volumen/reacción	Concentración final
Buffer PCR (10X)	5 µl	1 X
dNTPs (10 mM cada uno)	1 µl	200 µM cada dNTP
Solución Q (5x)	10 µl	1 X
Cebador F (10 µM)	1.5 µl	300 nM
Cebador R (10 µM)	1.5 µl	300 nM
Taq DNA polymerasa	0.25 µl	2.5 unidades/reacción
ADN	1 µg ADN (µl variables)	20 ng/ µl
Agua libre de DNasas y RNasas	x µl hasta 50 µl de volumen final	-
Volumen total	50 µl	-

El volumen de cada reactivo debe multiplicarse por el número de muestras a amplificar añadiendo a este número dos más para los controles negativos. Para la elaboración de los controles negativos, en lugar de ADN se añadió el agua utilizada para la preparación de la reacción mezcla. Los cebadores utilizados fueron los siguientes:

	Secuencia 5'-3'	pb del cebador	pb del producto amplificado	Referencia del gen
Cebador directo (F)	ATGGTGAAAAGCCACATAGGCAGT	24	795	NM_001009481.1
Cebador reverso (R)	CTATCCTACTATGAGAAAAATGAG	24		

Antes de introducir los strips en el termociclador, su contenido se mezcló con vortex y se centrifugó levemente. El programa empleado en el termociclador para la llevar a cabo la PCR fue:

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94ºC	3 min	1
Desnaturalización	94ºC	45 seg	35
Alineamiento	60ºC	45 seg	
Elongación	72ºC°	1 min	
Extensión final	72ºC	10 min	1
Conservación	4ºC	∞	-

Electroforesis

Para comprobar que la PCR había funcionado correctamente y que no se habían producido contaminaciones se realizaba una electroforesis en un gel de agarosa al 2% en TBE (1X) usando como agente intercalante del ADN un 0.01% de Gel Green Nucleic Acid Gel Stain (Biotium). Esta técnica permite la visualización de los fragmentos de PCR amplificados al exponerlos a la luz ultravioleta y la estimación de su tamaño comparando la altura de sus bandas con la de un marcador de talla molecular. De cada muestra se analizaron 8 µl del producto final de la PCR

mezclados con 2 µl del tampón de carga (glicerol + azul de bromofenol). Como marcador de talla molecular se utilizó E-Gel Low Range Quantitative DNA Ladder (de 100 pb a 2.000 pb) (Invitrogen). Para la electroforesis las condiciones fueron 100 V durante 20 minutos.

Una vez terminada la electroforesis, los geles se analizaron en el sistema UVP BioSpectrum 815 Imaging. El resultado era aceptado si se observaba una única banda a la altura estimada del fragmento amplificado y en los controles negativos no había ninguna señal de amplificación.

Purificación del ADN

Para la purificación del ADN se emplearon las placas de filtración MultiScreen PCR 96 (Merk). Todo el producto resultante de la PCR de cada muestra se cargaba en un pocillo de la placa de filtración. Una vez cerrada la placa se acoplaba al colector de vacío Multiscreen (Merck) conectado a una bomba de vacío. Aplicando una presión de 25 pulgadas Hg durante 5 minutos, el ADN quedaba retenido en el filtro mientras que el resto de componentes de la disolución atravesaban el filtro. A continuación, el ADN se resuspendía añadiendo 40 ul de agua libre de DNasas y RNasas en cada pocillo. Finalmente, los 40 µl de la disolución de ADN se transferían a eppendorfs de 0.2 ml y se almacenaban a -20ºC hasta su secuenciación.

Secuenciación

Una vez amplificado y purificado el ADN se enviaba a secuenciar junto con una alícuota de cada cebador al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional, perteneciente al Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

Análisis de la secuencia amplificada

Las secuencias fueron analizadas con el software Chromas. Este programa permite visualizar las secuencias de gen *Prnp* amplificadas y localizar los nucléotidos correspondientes al codón 136, 154 y 176 para determinar qué aminoácido codifican y averiguar el genotipo de la oveja.

3. Estudios de expresión génica.

3.1. Conservación de las muestras.

El análisis del ARN mensajero (ARNm) requiere la utilización de métodos de conservación específicos para estabilizar y proteger el ARN. Para evitar la degradación del ARN se utilizó la solución de estabilización RNAlater (Qiagen) que facilita la inmediata preservación de las muestras tomadas durante la necropsia. Los fragmentos de tejido muestreados (no superiores a 0,5 cm en ninguna de sus dimensiones) fueron sumergidos en un volumen de 2 ml de RNAlater dispensado en eppendorfs de 4 ml para favorecer que la solución penetrara por toda la muestra. Una vez finalizada la toma de muestras, los eppendorfs fueron almacenados durante 24 horas a 4ºC y después a -80ºC hasta la extracción del ARN.

3.2. Extracción de ARN total a partir de muestras de tejido nervioso.

Para la extracción del ARN a partir de muestras del encéfalo ovino y murino, se utilizó el kit de extracción RNeasy Lipid Tissue mini kit (Qiagen). Este kit está diseñado específicamente para

tejidos con un alto contenido lipídico ya que integra en su protocolo la lisis del tejido en trizol. Para la eliminación del ADN genómico, se acopló al protocolo de extracción un tratamiento con ADNasas utilizando el kit RNase-Free DNase Set (Qiagen). A continuación se describe brevemente el protocolo empleado.

Para la lisis del tejido se homogeneizaron 90 mg de tejido en 1 ml de QIAzol (trizol) en eppendorfs con microesferas de cerámica usando el TeSeE PRECESS 48 Homogenizer (Biorad). Seguidamente, todo el homogeneizado se transfirió a un eppendorf y se mezcló con 200 µl de cloroformo para separar la disolución en tres fases mediante centrifugación: la fase intermedia que es blanquecina, la fase acuosa e incolora que aparece en la parte superior y que contiene el ARN y la fase orgánica que aparece en la parte inferior con un color rojizo y que contiene el ADN y las proteínas. La fase acuosa se mezcló con un volumen equivalente de etanol al 70% y todo el volumen obtenido se cargó en las columnas suministradas con el kit para fijar el ARN a la membrana mediante centrifugación. Para eliminar el ADN genómico, tras lavar las columnas con el buffer RW1, se pipeteó directamente sobre la membrana de las columnas la disolución con la enzima DNasa que debía incubarse a temperatura ambiente durante 15 minutos antes de realizar los últimos lavados con el buffer RW1 y RPE. Finalmente se realizó una última centrifugación para recoger la elución final del ARN añadiendo 50 µl de agua libre de DNasas y RNasas directamente sobre el filtro. El ARN extraído de las diferentes regiones del SNC se guardó a -80ºC hasta su utilización.

3.3. Extracción de ARN total a partir de muestras intestinales.

Durante la puesta a punto de la técnica, se determinó que la cantidad de ADN genómico que quedaba en las muestras de íleon era demasiado alta si se utilizaba un kit genérico de Qiagen para la extracción de ARN a partir de tejidos animales al que se le acoplaba un tratamiento con DNAsas. Consecuentemente, se optó por el kit de extracción de ARN RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) que incorpora unas columnas diseñadas específicamente para la eliminación de gran parte del ADN genómico tras la homogeneización de las muestras. A continuación, se describe brevemente el protocolo empleado.

En este caso, 25 mg de cada muestra se homogeneizó en 600 µl de buffer RLT con un 1% de β-Mercaptoetanol en eppendorfs con microesferas de cerámica usando el TeSeE PRECESS 48 Homogenizer. El lisado obtenido se centrifugó para recoger el sobrenadante y así transferirlo a una columna gDNA Eliminator suministrada con el kit evitando cualquier resto de tejido no digerido. Seguidamente, las columnas se centrifugaron para retener en el filtro el material insoluble que pudiera obstruir las columnas en los siguientes pasos. Todo el filtrado recogido en el tubo colector se mezcló con etanol al 70% y, tras transferir todo el volumen a una nueva columna, se centrifugó para fijar el ARN a la membrana. Después, el ARN se lavó con el buffer RW1 y RPE. Finalmente, se recogió el ARN realizando una elución final añadiendo 50 µl de agua libre de DNasas y RNasas directamente sobre el filtro realizando una última centrifugación. El ARN extraído se guardó -80ºC hasta su utilización.

3.4. Determinación de la calidad y concentración del ARN total

La determinación de la calidad y la concentración del ARN extraído se realizó midiendo las absorbancias a 260 y 280 nm de las eluciones de ARN obtenidas en la fase final de extracción con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific). La concentración de ARN la calcula el propio Nanodrop pero la calidad debe interpretarse a partir de los cocientes de las absorbancias 260/280 y 230/260. Así, para el cociente 260/280 un valor mayor a 1.8 y próximo a 2.0 fue valorado como aceptable. Para el cociente 260/230 se consideró como aceptable el rango 2.0-2.2.

3.5. Tratamiento con DNasas para la eliminación de ADN genómico.

Para la eliminación del ADN genómico en las muestras de íleon, se utilizó el kit Turbo DNA-free (Ambion). De cada muestra se trataron un total de 5 µg de ARN en un volumen de reacción final de 50 µl mezclando los diversos reactivos del kit en la proporción detallada a continuación:

Reactivo	Volumen/reacción
Buffer TURBO DNase (10X)	5 µl
TURBO DNase (2 U/µl)	1 µl
ARN	5 µg ARN (µl variables)
Agua libre de DNasas y RNasas	x µl hasta 50 µl de volumen final
Volumen total	50 µl

Para la digestión del ADN genómico, las muestras se incubaron a 37ºC durante 20 minutos en un termociclador. Para inactivar la DNasa se añadieron 5 µl del reactivo DNase inactivation a cada muestra y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las disoluciones se centrifugaron para generar un pellet y poder recoger el sobrenadante que contenía el ARN tratado. Dicho sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf para guardarlo a -80ºC hasta su utilización.

3.6. Síntesis de ADN complementario a partir de ARN total

A partir del ARN total obtenido, se realizó la síntesis de ADN complementario mediante retrotranscripción utilizando como plantilla el ARNm contenido en el ARN total extraído. Para ello se utilizó el kit qScript cDNA SuperMix (Quantabio) que contiene en una única disolución el buffer para la reacción, los nucleótidos de sustrato (dNTPs), $MgCl_2$, los cebadores y la enzima de retrotranscripción. De cada muestra se retrotranscribió el volumen equivalente a 1 µg de ARN total mezclándolo con 4 µl de qScript cDNA SuperMix (5x) y agua libre de DNasas y RNasas hasta hacer un volumen total de 20 µl de reacción. El programa empleado en el termociclador para la llevar a cabo la retrotranscripción se indica a continuación. Finalizada la reacción, las muestras se conservaron a -20ºC hasta su utilización.

Temperatura	Tiempo
25ºC	5 min
42ºC	30 min
85ºC	5 min
4ºC	∞

3.7. PCR a tiempo real

La PCR a tiempo real, o PCR cuantitativa (qPCR), es una modificación de la técnica de PCR convencional que permite cuantificar de forma relativa o absoluta la cantidad de un fragmento de ADN presente en la muestra original. La cantidad de ADN que se amplifica en cada ciclo es medida gracias al uso de fluoróforos que incrementan su señal en cada ciclo de forma directamente proporcional al número de moléculas de ADN generadas. En esta tesis todas las reacciones se llevaron a cabo con el fluoróforo Sybr Green que es un agente intercalante que se une a la doble hebra de ADN.

Diseño de los cebadores

La búsqueda de las secuencias nuecleotídicas de los genes de interés se realizó en la base de datos GenBank y Ensembl. Si el gen tenía más de un exón publicado, se procuró diseñar los cebadores en exones diferentes para expandir intrones o en las uniones exón/exón para que fueran específicos para la detección del ADN complementario. Sin embargo, algunos genes analizados solo tenían un exón publicado y en otros casos los exones eran demasiado cortos para diseñar los cebadores de forma específica para la detección del ADN complementario. Como consecuencia, todas las muestras tuvieron que ser tratadas con DNasas (como se ha explicado anteriormente) ya que algunos de los cebadores no pudieron diseñarse para la detección específica del ADN complementario.

Para el diseño de los cebadores se empleó el programa Primer3Plus. Esta herramienta bioinformática permite el diseño de cebadores para la amplificación de la secuencia de interés estableciendo una serie de parámetros como:

- Tamaño del amplicón: 50-150.
- Tamaño de los cebadores: 18-24.
- Porcentaje guanina/citosina de los cebadores: 40-60%.
- Temperatura de fusión (Tm) de los cebadores 57-63 ºC.
- Temperatura de alineamiento: debe ser inferior en 5ºC a la de fusión.
- Diferencia entre la Tm de los cebadores: máxima diferencia de 1ºC.
- No repetir más de 4 bases de forma consecutiva.
- Evitar que la secuencia del cebador acabe en "GC" en el extremo 3'.

Una vez diseñados los cebadores, se analizó su calidad *in silico* con el programa *NetPrimer*. Este programa permite evaluar las variables termodinámicas de los amplicones y la formación de dímeros y horquillas. La especificidad de los cebadores fue evaluada *in silico* a través de la herramienta bioinformática BLAST. Una vez introducidas las secuencias de los cebadores este programa compara las secuencias con su base de datos y muestra las secuencias similares o idénticas que pueden alinearse con los cebadores diseñados. Si los datos del análisis coincidían con la especie y el gen de interés y no mostraban que los cebadores podían alinearse con otros genes, el diseño era validado.

Especificidad y eficiencia de los cebadores

Para evaluar la especificidad de los cebadores, cada pareja de cebadores se probó a diferentes concentraciones (de 100 a 500 nM) mediante PCR convencional y se evaluó el producto final en un gel de agarosa al 2%. Los cebadores fueron considerados específicos si el análisis de dichos geles reflejaba la amplificación de una única banda a la altura esperada respecto a un marcador de talla (procedimiento similar al descrito en la secuenciación del gen *Prnp*). A continuación, las concentraciones a las que los cebadores habían funcionado mejor (según el tamaño de la banda observado en el gel de agarosa) fueron probadas mediante qPCR para determinar su eficiencia.

Para evaluar la eficiencia de cada pareja de cebadores, se prepararon 5 diluciones seriadas a 1:10 partiendo de una cantidad conocida de 20 ng de ADN complementario. El logaritmo de cada concentración conocida de la dilución (eje X) se representó frente al valor de Ct para esa concentración (eje Y) y se calculó la ecuación de la recta de regresión, el valor de su pendiente y el coeficiente de correlación. Con el valor de la pendiente, se calculó la eficiencia de la reacción con la fórmula:

$$\text{Eficiencia} = [10^{(-\frac{1}{\text{pendiente}})} - 1] \times 100$$

El rango considerado óptimo para la eficiencia fue de 90-110%, lo que corresponde con una pendiente de entre -3.58 y -3.10.

Por último, después de cada qPCR se realizaba siempre una curva de fusión (del inglés *melting-curve*) para comprobar que no se habían producido artefactos asociados a la formación de dímeros durante la reacción y que no se habían amplificado productos inespecíficos.

PCR cuantitativa

Para el análisis de la expresión génica se utilizaron los cebadores de las tablas 6 y 7 a la concentración especificada en ellas y los siguientes componentes para cada reacción:

Componente	Volumen/reacción	Concentración final
RealQ Plus 2x Master Mix Green Low Rox (Amplicon)	5 µl	1 X
Cebador F (10 µM)	µl variables	variable nM
Cebador R (10 µM)	µl variables	variable nM
ADNc (5 ng/µl)	2 µl	1 ng/ µl
Agua libre de DNasas y RNasas	x µl hasta 10 µl de volumen final	-
Volumen total	10 µl	-

Cada muestra se analizó por triplicado en el equipo Quanta Studio 3 (Applied Biosystems) realizando el siguiente ciclo:

Fase	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	95ºC	15 min	1
Desnaturalización	95ºC	25 seg	40
Alineamiento	60ºC	1 min	
Curva de fusión	95ºC	15 seg	1
	60 ºC	1 min	
	95ºC	15 seg	

Tabla 6. Secuencia de los cebadores empleados para la especie ovina, concentracionesa las que se usaron, referencia del gen en la base de datos del NCBI y origen del cebador (diseñado/publicado).

Gen	Cebador directo (F) y reverso (R), (5'-3')	Concentración (nM) de los cebadores	Referencia	Diseñado/ Referencia
Cebadores de la especie ovina				
TLR1	**F** CCCACAGGAAAGAAATTCCA **R** GGAGGATCGTGATGAAGGAA	900	NM_001135060.2	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR2	**F** ACGACGCCTTTGTGTCCTAC **R** CCGAAAGCACAAAGATGGTT	900	NM_001048231.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR3	**F** GAGGCAGGTGTCCTTGAACT **R** GCTGAATTTCTGGACCCAAG	900	NM_001135928.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR4	**F** ACTGACGGGAAACCCTATCC **R** CAGGTTGGGAAGGTCAGAAA	900	NM_001135930.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR5	**F** AAAACCACATCGCCAACATC **R** CATCAGATGGAACTGGGACA	900	NM_001135926.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR6	**F** CAAAGCAGGGAACAATCCAT **R** CCACAATGGTGACAATCAGC	900	NM_001135927.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR7	**F** ACTCCTTGGGGCTAGATGGT **R**GCTGGAGAGATGCCTGCTAT	900	NM_001135059.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR8	**F** CACATCCCAGACTTTCTACGA **R** GGTCCCAATCCCTTTCCTCTA	900	NM_001135929.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR9	**F** CTCGTATCCCTGTCGCTGAG **R** CACCTCCGTGAGGTTGTTGT	900	NM_001011555.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TLR10	**F**TCTGCCTGGGTGAAGTATGA **R** AATGGCACCATTCAGTCTGG	900	NM_001135925.1	(Menzies & Ingham, 2006)
TNF-α	**F**CAAATAACAAGCCGGTAGCC **R** TGGTTGTCTTTCAGCTCCAC	200	NM_001024860.1	(Pelegrin-Valls et al., 2020)
TGF-β	**F**TTGACGTCACTGGAGTTGTG **R**CGTTGATGTCCACTTGAAGC	200	NM_001009400.2	(Pelegrin-Valls et al., 2020)
IL-10	**F** TTAAGGGTTACCTGGGTTGC **R**TTCACGTGCTCCTTGATGTC	200	NM_001009327.1	(Pelegrin-Valls et al., 2020)
IL-6	**F** CGAGTTTGAGGGAAATCAGG **R** GTCAGTGTGTGTGGCTGGAG	300	NM_001009392.1	(Yang et al., 2019)
MyD88	**F**CTGCAAAGCAAGGAATGTGA **R**AGGATGCTGGGGAACTCTTT	400 300	NM_001166183.1	Diseñado
Trif	**F** GCACGTCTAGCCTGCTTACC **R** AGGTGTTGGTCACCTTCCTG	300	XM_042250120.1	Diseñado
CD36	**F** GCAAAACGGCTGCAGATCAA **R** AGCAATGGTGGCAGTCTCAT	300	XM_012176565.4	Diseñado
CD14	**F** CTCAGCGTGCTTGATCTCAG **R** AAGGGATTTCCGTCCAGAGT	300	NM_001077209.2	Diseñado
CD68	**F** GTCCTGCTACCACCACCAGT **R** GCTGGGAACCATTACTCCAA	400	XM_004012666.5	Diseñado
Mfge8	**F** CCCTCCCTTCTACTGCCTCT **R** TTGCAGGTGTAATGGGTGAA	300	XM_027957063.2	Diseñado
Tollip	**F** GTCGTGGACGAGTGGTACAG **R** GTACGACAGCACCAGGTTGA	300	XM_027959319.1	Diseñado
ACTβ	**F**CTGGACTTCGAGCAGGAGAT **R** GATGTCGACGTCACACTTC	600	NM_001009784	(Pelegrin-Valls et al., 2020)
GAPDH	**F** TCCGGGAAGCTGTGGCGTGA **R** GGGATGACCTTGCCCACGGC	500	NM 001190390.1	(Mahakapuge et al., 2016)

Tabla 7 Secuencia de los cebadores empleados para la especie murina, concentraciones a las que se usaron, referencia del gen en la base de datos del NCBI y origen del cebador (diseñado/publicado).

Gen	Cebador directo (F) y reverso (R), (5'-3')	Concentración (nM) de los cebadores	Referencia	Diseñado/ Referencia
Cebadores de la especie murina				
TLR1	**F** TGGACCCAGAGTTTGTTAGTTTT **R**GCTCATTATCCTGTTGTTGTGAAG	150 300	XM_006503856.3	Diseñado
TLR2	**F**GCCACCATTTCCACGGACT **R**GGCTTCCTCTTGGCCTGG	500	NM_011905	(Grasa et al., 2015)
TLR3	**F**TTGTCTTCTGCACGAACCTG **R**CCCGTTCCCAACTTTGTAGA	300	XM_006509283.4	Diseñado
TLR4	**F** AGAAATTCCTGCAGTGGGTCA **R**CTCTACAGGTGTTGCACATGTCA	500	NM_021297	(Grasa et al., 2015)
TLR5	**F** GCCACATCATTTCCACTCCT **R** ACAGCCGAAGTTCCAAGAGA	200	XM_017321704.2	(Cashman & Morgan, 2009)
TLR6	**F**ACACAATCGGTTGCAAAACA **R**GGAAAGTCAGCTTCGTCAGG	300 400	NM_001384171.1	Diseñado
TLR7	**F** GGTATGCCGCCAAATCTAAA **R**GCTGAGGTCCAAAATTTCCA	400 500	XM_006528713.2	Diseñado
TLR8	**F**GAAGCATTTCGAGCATCTCC **R**GAAGACGATTTCGCCAAGAG	200	XM_017318405.2	(Cashman & Morgan, 2009)
TLR9	**F** CAACCTCAGCCACAACATTC **R** CACACTTCACACCATTAGCC	200	NM_031178.2	(Cashman & Morgan, 2009)
MyD88	**F** CATGGTGGTGGTTGTTTCTGAC **R**TGGAGACAGGCTGAGTGCAA	500	NM_010851.3	(Williams et al., 2007)
TNF-α	**F** TAGCCAGGAGGGAGAACAGA **R** TTTTCTGGAGGGAGATGTGG	300	NM_013693.3	Diseñado
TGF-ß	**F** TGAGTGGCTGTCTTTTGACG **R** AGCCCTGTATTCCGTCTCCT	500	XM_036152883.1	Diseñado
IL-10	**F** CACAAAGCAGCCTTGCAGAA **R** AGAGCAGGCAGCATAGCAGTG	400	NM_010548.2	Buchholz, B. et al (2009)
IL-6	**F** CCGGAGAGGAGACTTCACAG **R** TCCACGATTTCCCAGAGAAC	500	NM_001314054.1	Diseñado
GAPDH	**F**CCTCGTCCCGTAGACAAAATG **R** TGAAGGGGTCGTTGATGGC	250	XM_036165840.1	(Wang et al., 2010)
ACTβ	**F** CTTCTTTGCAGCTCCTTCGTT **R**TTCTGACCCATTCCCACCA	250	NM_007393.5	(Wang et al., 2010)

Los genes de referencia empleados para la normalización de los resultados fueron *GAPDH* y *ß-actina* ya que habían sido validados para la normalización de la expresión de los genes problema en los tejidos empleados en esta Tesis (Garcia-Crespo et al., 2005). Además, dichos genes demostraron que su expresión relativa se mantenía constante en las condiciones experimentales analizadas.

Los resultados de la PCR a tiempo real fueron analizados con el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$. En primer lugar, se calculó ΔCt como la diferencia de expresión entre el gen de estudio y el de referencia (ΔCt= $Ct_{gen\ estudio}$ - $Ct_{gen\ de\ referencia}$). A continuación, se calculó ΔΔCt como la diferencia entre la muestra problema y el control (ΔΔCt= $\Delta Ct_{muestra} - \Delta Ct_{control}$). Finalmente, el cálculo de la expresión relativa de ARN de cada muestra respecto al control, es decir, las veces de cambio en la expresión del gen de estudio, se realizó como potencia en base 2 de -ΔΔCt respecto a la condición control ($2^{-(\Delta\Delta Ct)}$).

4. Estudios de expresión proteica

El análisis de la expresión proteica mediante WB se fundamenta en la especificidad de la unión del antígeno-anticuerpo para poder identificar una proteína concreta entre una gran cantidad de ellas. La cuantificación proteica puede realizarse de forma relativa a una proteína o de forma absoluta calculando una recta patrón a partir de unas muestras de concentración conocida. Para esta tesis, se utilizó la cuantificación relativa utilizando como proteína de referencia la β-actina.

En el WB las proteínas pueden ser analizadas en condiciones no reductoras y no desnaturalizantes (Native PAGE), o se puede incorporar dodecilsulfato sódico (SDS) en el buffer de la muestra o de electroforesis para conseguir que se desnaturalicen y se disocien (SDS-PAGE). Para la realización de esta tesis, todos los WB se llevaron a cabo en condiciones desnaturalizantes añadiendo SDS en el buffer de la muestra y, en algunos casos, β-mercaptoetanol que actúa como agente reductor para romper los puentes disulfuro de las proteínas.

En la primera fase del WB se separan las proteínas según su peso molecular mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida preparado a una concentración variable según el tamaño de la proteína de interés. Dicho gel debe ser montado en una cubeta y cubierto con un buffer de electroforesis para que al aplicar un campo eléctrico las proteínas migren del cátodo al ánodo. Después, las proteínas son transferidas a una membrana adsorbente de difluoruro de polivinilideno (PVDF) sobre la que se realiza la inmunodetección con anticuerpos específicos y su posterior visualización. Debido a la afinidad de las membranas de PVDF por las proteínas, después de la transferencia es necesario bloquear los sitios de unión que han quedado libres ya que, en caso contrario, el anticuerpo primario podría unirse a ellos. Las soluciones proteicas de bloqueo empleadas en esta tesis se elaboraron con albúmina de suero bovino (BSA) o leche en polvo desnatada diluidas en PBST.

Para la inmunodetección el método empleado en esta Tesis y más común en general, es el uso de anticuerpos secundarios conjugados con una enzima, en este caso, la peroxidasa del rábano. Gracias al uso de este tipo de anticuerpos, según el tipo de sustrato que se añada a la enzima, la inmunodetección se puede llevar a cabo por métodos colorimétricos, quimiolininiscentes o fluorescentes. En nuestro estudio se empleó el método de quimioluminiscencia en el que el producto generado por la enzima emite una luminiscencia que es captada y almacenada como imagen digital por el equipo UVP BioSpectrum 815 Imaging System.

4.1. Determinación de la concentración proteica de las muestras

Antes de llevar a cabo el WB es necesario determinar la concentración proteica de las muestras para poder realizar posteriormente un análisis semicuantitativo. Para determinar la concentración proteica se utilizó el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific). Este kit combina el método de Biuret, en el que el Cu^{+2} se reduce a Cu^{+1} en las proteínas en un medio básico, con el uso del ácido biciconínico (BCA), capaz de formar un complejo púrupura con los iones Cu^{+1}. Gracias a estas reacciones, las proteínas pueden cuantificarse mediante una técnica colorimétrica midiendo la absorbancia a 540-590 nm. Para estimar la concentración de las muestras problema, se elabora una recta patrón con unos estándares de BSA a concentraciones conocidas. El protocolo empleado se detalla a continuación.

Antes de lisar las muestras, se diluyó una pastilla del coctel de inhibidores de proteasas Complete EDTA-free protesase (Roche) en 10 ml del tampón de lisis (RIPA) para reducir la degradación proteica de las muestras. Las muestras se homogeneizaron al 10% (0.1 g en 1 ml) en el tampón de lisis preparado utilizando tubos con microesferas de cerámica en el TeSeE PRECESS 48 Homogenizer. Dado que el kit de BCA solo puede cuantificar un rango de concentración proteica de 20-2.000 µg/ml, 100 µl de cada muestra fue diluida de nuevo a 1:10 para evitar saturar la reacción. Tras preparar los estándares de BSA y la solución de trabajo siguiendo el protocolo del kit, en una placa de 96 pocillos se dispensaron 25 µl de cada muestra por triplicado y 25 µl de cada estándar de BSA también por triplicado al pocillo correspondiente según el diseño de placa previsto. A continuación, se añadían 200 µl de la solución de trabajo a cada pocillo, se mezclaba la placa en agitación durante 30 segundos y se incubaba a 37ºC durante 30 minutos. Finalmente la absorbancia de las muestras se midió en el rango 540-590 nm.

Para estimar la concentración de las muestras problema, se elaboró una recta patrón con los estándares de BSA de concentraciones conocidas y se calculó la recta de regresión y su coeficiente de correlación. Conocida la fórmula de la recta, se sustituyó el valor X por el valor de la absorbancia de cada muestra problema para calcular el valor Y que correspondía con la concentración de la muestra en µg/ml.

4.2. Western blot para la detección de PrP^{Sc}

La detección específica de la PrP^{Sc} requiere la digestión de las muestras con PK por lo que para esta técnica no se añadieron inhibidores de proteasas en el tampón de lisis al homogeneizar las muestras. El protocolo empleado para esta técnica se describe a continuación.

Las muestras del SNC de las ovejas y ratones y el íleon de las ovejas se homogeneizaron al 10% 0.1 g en 1 ml) en el tampón de lisis en tubos con micoresferas de cerámica usando el TeSeE PRECESS 48 Homogenizer. Cien µl de cada homogeneizado se mezclaron con 100 µl al 10% (w/v) de un homogeneizado de encéfalo procedente de una oveja sana y con 200 µl de una disolución de sarkosil-SDS con PK. La disolución de sarkosil-SDS contenía un 80% de sarkosil (al 10% en agua), un 20% de SDS (al 20% en agua) y 72 mg/ml de PK. Después, la mezcla se incubó en un termoblock durante 15 minutos a 37ºC. Pasado ese tiempo, se añadieron 200 µl de butanol a cada muestra y se centrifugó hasta generar unos pellets en el fondo de los eppendorfs. El sobrenadante se desechó y tras dejar secar los pellets se resuspendieron con 50 µl del tampón de carga y se incubaron a 4ºC durante 5 minutos. Por último, antes de cargar las muestras en el gel, se incubaron a 100ºC durante 5 minutos en un termoblock.

Para la electroforesis, se cargaron 25 µl de cada muestra en los pocillos usando los geles 4-12% Criterion XT Bis-Tris Protein Gel (Biorad). En cada gel se reservó al menos un pocillo para el marcador de talla Precision Plus Protein™ Dual Color Standard (Biorad). La cubeta de electroforesis se rellenó con el buffer XT MES (Biorad) y la electroforesis realizó a 80V durante 30 minutos, seguida de otro ciclo a 150 V durante 90 minutos. Finalizada la electroforesis, el gel se montó sobre una membrana de PVDF Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm (Biorad) y la transferencia se llevó a cabo usando el protocolo prediseñado de 2.5 A y 25 V durante 10 minutos en el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer (Biorad).

Antes de la inmunodetección, las membranas se bloquearon durante una hora en una solución de bloqueo preparada con PBST y leche desnatada al 5%. Tras lavar las membranas con PBST, se incubaron con el anticuerpo primario SHA31 (Bertin Bioreagent, A03213) a 1:8.000 durante una hora, seguida de otra incubación con el anticuerpo secundario m-IgGκ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102) a 1:5.000 durante una hora. Finalmente, las membranas se revelaron incubándolas durante un minuto con el kit Immnobilon Crescendo Western HRP substrate (Merk) para la visualización de las bandas por quimioluminiscencia.

4.3. Western blot para la cuantificación del TLR4 y TLR7

Una vez realizada la BCA y conocida la concentración proteica de las muestras, éstas eran diluidas a una concentración de 4 ng/µl en el mismo tampón de lisis utilizado para la BCA. A continuación, 50 µl de cada muestra se mezclaba con 50 µl del tampón de carga Laemmli 2X (Biorad) con un 5% de β-Mercaptoetanol. De este modo, la concentración final de las muestras en la electroforesis fue de 2 ng/µl. Antes de cargar las muestras en el gel, se incubaban a 95ºC durante 5 minuntos en un termoblock.

Para la electroforesis se cargaron 40 µg de cada muestra para el análisis del TLR4 y 50 µg para el TLR7 usando los geles 7.5 % Criterion TGX Precast Midi protein (Biorad) reservando al menos un pocillo para el marcador de talla Precision Plus Protein™ Dual Color Standard. Como buffer de electroforesis se utilzó el buffer 10X Tris Glycine SDS (Biorad). Las condiciones de la electoforesis fueron de 80V durante 30 minutos y 130V durante 90 minutos. Finalizada la electroforesis, los geles se montaron sobre las membranas PVDF Trans-Blot Turbo Midi 0.2µm (Biorad) y la transferencia se llevó a cabo usando el protocolo de 2.5 A y 25 V durante 7 minutos en el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo Transfer.

Para visualizar el resultado de la transferencia, primero se bloquearon las membranas durante 2 horas en una solución de bloqueo preparada con PBST y BSA al 4% y tras lavarlas con PBST se incubaron durante toda la noche a 4ºC con los anticuerpos primarios: TLR4 (NovusBio, NBP2-24538) a 0.5 µg/ml diluido en PBST con BSA al 2% y el TLR7 (Abcam, ab124928) a 1/1000 diluido en PBST con BSA al 2%. Al día siguiente, tras dejar atemperar las membranas a temperatura ambiente, se lavaron con PBST y se incubaron durante una hora con el anticuerpo secundario goat anti-rabbit IgG (H+L) HRP (Invitrogen, 31460) a 1:20.000. Finalmente, las membranas se revelaron incubándolas durante un minunto con el kit Immnobilon Crescendo Western HRP substrate para la visualización de las bandas por quimioluminiscencia.

Una vez analizado el TLR4 o el TLR7, se eliminaron los anticuerpos primarios y secundarios unidos a la membrana de PVDF realizando un *stripping.* Este tratamiento es necesario para analizar más de una proteína en una misma membrana de PVDF, como en este caso el TLR4 o el TLR7 y la β-actina. Antes de proceder con el *stripping* se lavaron las membranas con PBST varias veces para eliminar el quimioluminiscente e incubaron a 37ºC durante 15 minutos con los mililitros necesarios del tampón de lavado de inmunotransferencia (ThermoFisher) para cubrir la membrana. Tras el tratamiento, se lavaron las membranas con PBST y se bloquearon de nuevo durante una hora con leche desnatada al 4% en PBST.

Para la inmunodetección de la β-actina, las membranas se incubaron 2 horas con el anticuerpo primario actin (H-6) (Santa Cruz Biotechnology, sc-376421) a 1:1.000. Tras lavarlas con PBST, se incubaron con el anticuerpo secundario m-IgGκ BP-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-516102) a 1:5.000 durante una hora y se revelaron siguiendo el mismo procedimiento anteriormente explicado.

4.4 Análisis semicuantitativo de la expresión proteica

La cuantificación de los niveles de expresión proteica se realizó con el programa de análisis de imagen *ImageJ* y fueron referenciados sobre la expresión de β-actina. Este programa permite la selección de varias regiones de interés (ROI) trazando rectángulos del mismo tamaño alrededor de las bandas a analizar. Una vez seleccionadas todas las bandas el programa calcula la densidad relativa del contenido del rectángulo. A continuación, el valor de la densiometría de la muestra problema se normalizaba con el de la β-actina y los valores obtenidos son los que se analizaron estadísticamente y los que se representaron gráficamente en unidades arbitrarias (u.a) de densiometría.

5. Técnica de diagnóstico rápido para el scrapie clásico

Para la detección de la EEB y el scrapie existen kits de ensayos inmunoenzimáticos de detección rápida utilizando muestras de obex, como el kit HerdCheck BSE-Scrapie antigen test (IDEXX).Este kit suministra unas placas de 96 pocillos en cuyo fondo está adherido el anticuerpo de captación de la PrP^{Sc}. De este modo, al entrar en contacto la PrP^{Sc} de las muestras positivas a EEB o scrapie con el anticuerpo queda capturada en la superficie de los pocillos. A continuación, las placas se lavan para que todos los materiales no unidos, incluida la PrP^{C}, sean eliminados. Finalmente, se añade el anticuerpo de detección conjugado (HRP) y se añade el sustrato de la peroxidasa para analizar finalmente los resultados en un espectrofotómetro.

Dado que el diagnóstico *ante-mortem* de las enfermedades priónicas puede tener una baja sensibilidad, esta técnica se empleó para confirmar que las ovejas adultas seleccionadas para el experimento de inoculación oral con scrapie clásico eran negativas a scrapie. Para ello, a continuación se detalla brevemente el protocolo empleado.

A partir de las muestras de la médula oblongada de las ovejas utilizadas en los diferentes estudios, se tallaron 0.3 g de obex y se homogeneizaron con el TeSeE PRECESS 48 Homogenizer en unos tubos con microesferas suministrados con el kit que contienen una solución de lisis tamponada. Para el bloqueo de la PrP^{C} se transferieron 120 µl de cada muestra a una placa de 96 pocillos y se mezclaron con 30 µl de un diluyente (D1+D2) aportado con el kit. La detección de la PrP^{res} se realizó en una placa de 96 pocillos antigenada por lo que se transfirieron 100 µl de las muestras diluidas (dejando libre la posición para los controles), a la placa de captura de antígeno. Tras reconstruir los controles liofilizados siguiendo el protocolo del fabricante, se añadieron 100 µl de cada uno a la placa en la posición prevista. Seguidamente, las placas se lavaron con la solución de lavado 1 utilizando el sistema Columbus Pro Strip Washer (Tecan) con el programa IDEXX TESE 1 y tras secar los pocillos por inversión se incubaron durante 10 minutos a

temperatura ambiente añadiendo 100 µl del tampón de acondicionamiento a cada pocillo. Después se lavaron las placas con la solución de lavado 2 utilizando el sistema Columbus Pro Strip Washer (Tecan) con el programa IDEXX TESE 2, se secaron por inversión, y se añaderon 100 µl del conjugado. Añadido el conjugado, las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 45-50 minutos en reposo. A continuación, se volvieron a lavar las placas con la solución de lavado 2 utilizando el sistema Columbus Pro Strip Washer (Tecan) con el programa IDEXX TESE3 y se añadieron 100 µl de la solución de sustrato TMB. Con esta solución se incubaron durante un minuto en oscuridad y finalmente se añadieron 10 µl de la solución de parada (ácido clorhídrico 1M) a cada pocillo.

La lectura de las placas se realizó en un fotómetro bicromático a 450 nm con una longitud de onda de 650 nm con el software Magellan utilizando el programa IDEXX Scrapie.

6. Bioensayos

6.1. Ovejas adultas infectadas de forma natural con scrapie

Para analizar la respuesta inmunitaria frente al scrapie en cuatro regiones del SNC (médula oblongada, tálamo, hipocampo y corteza frontal) y en el íleon se seleccionaron ovejas infectadas de forma natural con scrapie y sanas procedentes de diferentes rebaños de la Comunidad Autónoma de Aragón. En la tabla 15 se detallan los datos de las ovejas utilizadas para el estudio del SNC e íleon. Las ovejas infectadas se obtuvieron a partir de rebaños en los que se habían declarado focos de scrapie según el Programa de Vigilancia y Control de la Comunidad Autónoma de Aragón. Dichos animales fueron seleccionados por mostrar signos clínicos compatibles con scrapie y/o por presentar depósitos de PrP^{Sc} en las muestras de biopsias de tejido linfoide de la mucosa rectal. Las ovejas seleccionadas fueron trasladadas a las instalaciones del Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza hasta su eutanasia mediante una inyección de pentobarbital sódico administrada vía intravenosa. En el momento de la eutanasia, las ovejas infectadas fueron evaluadas clínicamente y todas presentaban signos clínicos de diversa gravedad: algunas mostraban signos clínicos incipientes, como prurito en el dorso y los flancos al ser estimulados mediante rascado y una leve reducción de la condición corporal, mientras que otras presentaban signos clínicos avanzados como un prurito intenso en la cola, zona lumbar y extremidades, pérdida de lana, bruxismo, una condición corporal baja y signos neurológicos como ataxia y temblores de cabeza. Como controles negativos se seleccionaron cinco ovejas sin signos clínicos compatibles con scrapie ni depósitos de PrP^{Sc} en el tejido linfoide obtenido mediante biopsias. Tras la eutanasia se confirmó la presencia de PrP^{Sc} en las ovejas infectadas y la ausencia de PrP^{Sc} en las ovejas control por IHQ y WB.

Tabla 8. Información sobre las ovejas infectadas de forma natural con scrapie utilizadas para el análisis de los receptores tipo Toll en el sistema nervioso central (SNC) e íleon.

Nº oveja	Grupo	Fase clínica	Genotipo	Sexo	Edad (años)	Estudio del íleon	Estudio del SNC
1	Infectada	Incipiente	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	x
2	Infectada	Incipiente	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	
3	Infectada	Incipiente	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	x
4	Infectada	Incipiente	ARQ/ARQ	Hembra	6	x	x
5	Infectada	Incipiente	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	x
6	Infectada	Incipiente	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	x
7	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	-
8	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	-
9	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	-
10	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	-
11	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	4	x	x
12	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	x	-
13	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	4	-	x
14	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	-	x
15	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	-	x
16	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	5	-	x
17	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	5	-	x
18	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	3	-	x
19	Infectada	Avanzada	ARQ/ARQ	Hembra	4	-	x
20	Control	-	ARQ/ARQ	Hembra	6	x	x
21	Control	-	ARQ/ARQ	Hembra	5	x	x
22	Control	-	ARQ/ARQ	Hembra	5	x	x
23	Control	-	ARQ/ARQ	Hembra	6	x	x
24	Control	-	ARQ/ARQ	Hembra	2	x	x

Declaración ética

Todos los procedimientos empleados en este estudio cumplen los principios éticos y de protección animal para la experimentación que ha establecido la Universidad de Zaragoza y se adaptan a la normativa vigente (R.D. 53/2013). Además, los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal con código de identificación PI38/15.

6.2. Bioensayo en ratones tg338: inoculación vía intracerebral

Elaboración de los inóculos

Para la inoculación vía intracerebral de los ratones tg338 se homogeneizó por separado la médula oblongada de dos ovejas ARQ/ARQ, una positiva y la otra negativa a scrapie clásico, en suero salino fisiológico (SSF) al 10% (0.1 g por cada ml de suero) utilizando tubos de 1.5 ml con micoresferas de cerámica en el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48. El homogeneizado se filtró a través de una gasa estéril empleando una jeringuilla y se añadió 1 µl de antibiótico ESPES Inject (Casier) por cada 2 ml de inóculo. Para comprobar la esterilidad de los inóculos, se tomaron muestras y se cultivaron en placas en placas de agar sangre a 37ºC durante una noche. Finalmente, los inóculos fueron alicuotados y conservados a -80ºC hasta su utilización.

Procedimiento para la inoculación vía intracerebral, eutanasia y toma de muestras

La línea transgenética murina tg338 se caracteriza por la sobreexpresión de la PrP^c ovina en el cerebro a niveles 8-10 veces superiores respecto a los ratones *wyld-type*. Esta línea trasngenética se generó a partir de ratones *knock-out* para el gen *Prnp* a los que se les introdujo un inserto de ADN de 125 kb con la secuencia del gen *Prnp* de la oveja clonado en un cromosoma artificial bacteriano. Como resultado, esta línea murina es homocigota para dicho transgen con el alelo VRQ ovino (Le Dur et al., 2005).

La inoculación vía intracerebral se llevó a cabo en ratones de entre cinco y seis semanas de edad. Un total de dieciséis ratones tg338 fueron inoculados; ocho recibieron el inóculo positivo a scrapie y ocho el inóculo negativo. Todos los ratones fueron eutanasiados cuando los ratones infectados con scrapie alcanzaron una fase clínica avanzada, siendo su periodo medio de supervivencia de 187±26 días postinoculación. Para llevar a cabo esta técnica, los ratones fueron anestesiados con isofluorano por vía inhalatoria y tras comprobar su total inconsciencia mediante la realización de presión con los dedos en la parte distal de una extremidad posterior, se procedió a la inoculación con 20 µl del inóculo correspondiente. Para la inoculación se emplearon jeringuillas estériles diseñadas específicamente para este fin y agujas de 25 G estériles. Para evitar que la aguja se introdujera más de lo debido en el encéfalo del animal, se colocó un dispositivo plástico en la aguja para dejar al descubierto una longitud de unos 3 mm de la aguja. El punto de inoculación se calculó mediante la formación virtual de un triángulo equilátero entre el ojo, la base de la oreja y el propio punto de inoculación (Figura 15). Una vez terminado el procedimiento, se aplicó una dosis de analgesia con 0.3 mg/kg de buprenorfina por vía subcutánea.

Finalmente, los ratones inoculados con el homogeneizado positivo a scrapie fueron eutanasiados por dislocación cervical al alcanzar una fase clínica avanzada. Su periodo medio de incubación fue de 180 ±25 días y el de supervivencia de 187 ±26 días. Paralelamente se sacrificaron los ratones del grupo control inoculados con el homogeneizado negativo a scrapie. Tras su eutanasia se tomaron muestras de su encéfalo en RNAlater y formaldehido al 10%.

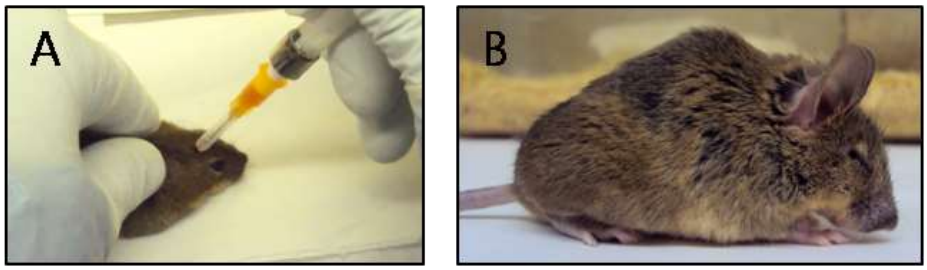


Figura 16. (A) Fotografía tomada durante el procedimiento de inoculación vía intracerebral de los ratones tg338. **(B)** Ratón tg338 en fase clínica avanzada con signos de cifosis y apático.

Declaración ética

Todos los procedimientos empleados en este estudiocumplen los principios éticos y de protección animal para la experimentación que ha establecido la Universidad de Zaragoza y se adaptan a la normativa vigente (R.D. 53/2013). Además, los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal con código de identificación PI29/17.

6.3. Bioensayo en ratones C57BL/6: inoculación vía intragástrica.

Elaboración de los inóculos

Para la inoculación vía intragástrica de los ratones C57BL/6 se homogeneizó al 10% (w/v) en SSF el encéfalo de un ratón tg338 inoculado vía intracerebral con un primer pase de scrapie clásico ovino y el encéfalo de un ratón tg338 negativo a scrapie. La homogeneización de los encéfalos se realizó en tubos de 1.5 ml con microesferas de cerámica utilizando el homogeneizador de tejidos TeSeE PRECESS 48. Los homogeniezados fueron transferidos a eppendorfs utilizando jeringuillas de 1 ml y agujas de 18 G para evitar cualquier resto orgánico mal triturado. Finalmente, los inóculos se conservaron a -80ºC hasta su utilización. En este caso no se añadió ningún antibiótico a los inóculos ya que podrían haber alterado los resultados del experimento, aunque la esterilidad de los inóculos se comprobó cultivando muestras en placas en placas de agar sangre a 37ºC durante unas 24 horas.

Procedimiento para la inoculación vía intragástrica, eutanasia y toma de muestras

Para detectar posibles cambios en la expresión génica de los *TLR* inducidos por la captación del prion a nivel intestinal en los ratones C57BL/6, el intervalo de tiempo entre la administración del inóculo y la eutanasia se estableció basándonos en dos estudios previos. En uno de ellos se había descrito el tránsito intestinal de un inóculo con PrP^{Sc} radiomarcada desde los primeros minutos postinoculación hasta las 24 horas postinoculación (Urayama et al., 2016) y en el otro estudio se había analizado la localización de neurofilamentos y partículas de PrP procedentes del inóculo en el interior de las células epiteliales y subepiteliales del intestino a las 6 horas postinoculación y los días 1, 2 y 7 postinoculación (Figura 17) (Kujala et al., 2011). Teniendo en cuenta ambos estudios se decidió eutanasiar a los ratones en dos momentos diferentes: a las 8 horas postinoculación, para analizar la expresión génica de los *TLR* en el momento en el que el inóculo todavía estaría siendo captado por las células epiteliales y habría comenzado a ser transferido a las células localizadas debajo del epitelio, y a las 20 horas postinoculación, momento en el que las células subepiteliales habrían recibido ya el contenido del inóculo y podrían haber comenzado a migrar hacia los tejidos linfoides más próximos.

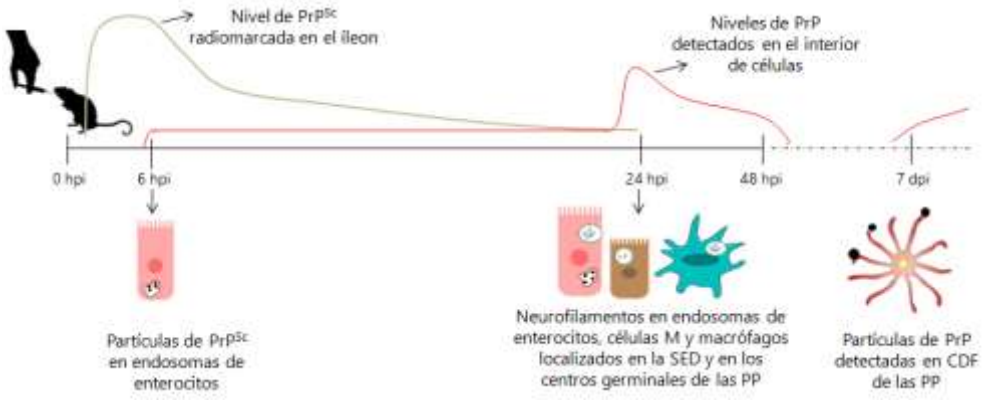


Figura 17. Esquema de los resultados de Kujala y colaboradores sobre la detección entre las 6 horas postinoculación (hpi) y los 7 días postinoculación (dpi) de la PrP procedente del inóculo mediante inmunofluorescencia y microscopía electrónica en ratones inoculados vía oral con un homogeneizado de encéfalos murinos positivos a scrapie y negativos, y los resultados de Urayama y colaboradores sobre los tiempos de tránsito de PrP^{Sc} radiomarcada por el íleon de ratones inoculados vía oral (Kujala et al., 2011; Urayama et al., 2016).

El número de animales utilizados en este estudio y el tipo de inóculo que recibieron se recogen en la tabla 9. En este caso, el volumen administrado vía intragástrica fue de 100 µl y se utilizaron tres tipos de inóculos: SSF para conocer la expresión de los dichos genes en condiciones basales, un homogeneizado de encéfalos murinos negativo a scrapie y un homogeneizado de encéfalos murinos positivos a scrapie. De este modo, además de determinar si la presencia de la PrP^{Sc} en el homogeneizado inducía cambios en la expresión génica, también se podría conocer si el homogeneizado negativo *per se* alteraba su expresión al comparar sus resultados con el suero.

Tabla 9. Diseño experimental para las inoculaciones vía intragástrica de los ratones C57BL/6.

Eutanasiados a las 8 horas postinoculación		**Eutanasiados a las 20 horas postinoculación**	
Inóculo administrado	Nº de animales	Inóculo administrado	Nº de animales
Scrapie +	8	Scrapie +	8
Scrapie -	8	Scrapie -	8
SSF	6	SSF	6

La inoculación vía intragástrica se llevó a cabo en ratones de 5 a 6 semanas de edad, mediante una sonda oral para evitar problemas de palatabilidad y porque es el método más preciso para la administración de sustancias en el tracto gastrointestinal. Los ratones fueron inmovilizados manualmente buscando el mejor ángulo de la cabeza para que la aguja entrase con facilidad (Figura 18). Para la inoculación se usó una aguja de punta roma, específica para este fin y esta especie, con una longitud de 30 mm y un diámetro de 20 G. Cada ratón recibió una dosis de 100 µl administrada a velocidad controlada y lenta para evitar su regurgitación. Transcurridas las 8 ó 20 horas postinoculación, los ratones fueron eutanasiados por dislocación cervical y se tomaron muestras del extremo más distal íleon, ciego y bazo en RNAlater y formaldehído tamponado al 10%.

Figura 18. Fotografías tomadas durante el procedimiento de inoculación vía intragástrica de los ratones C57BL/6.

Declaración ética

Todos los procedimientos empleados en este estudio cumplen los principios éticos y de protección animal para la experimentación que ha establecido la Universidad de Zaragoza y se adaptan a la normativa vigente (R.D. 53/2013). Además, los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal con código de identificación PI29/17.

6.4. Bioensayo en corderos y ovejas adultas: inoculación vía oral

Elaboración de los inóculos

Para la inoculación vía oral de los corderos y las ovejas adultas se prepararon dos homogeneizados de encéfalos ovinos diluidos al 50% (w/v) en SSF utilizando el homogeneizador PrioGENIZER (Prionics): uno de los homogeneizados se elaboró a partir de tres ovejas positivas a scrapie con genotipos ARQ/ARQ, ARQ/VRQ y VRQ/VRQ, y el otro con tres ovejas negativas a scrapie con los mismos genotipos. Los inóculos fueron almacenados en falcons estériles de 45 ml a -80ºC hasta su utilización.

Procedimiento para la inoculación vía oral, eutanasia y toma de muestras

En el caso de la especie ovina, el tiempo postinoculación en el que examinar cambios en los *TLR* tras la inoculación oral se determinó en función de los resultados de los estudios de de Vega y colaboradores que analizaron el tránsito intestinal de diferentes dietas en ovejas de once meses de edad de raza Rasa Aragonesa, y Jeffrey y colaboradores, en el que se administró un homogeneizado de encéfalos ovinos directamente en el íleon de corderos (de Vega et al., 1998; Jeffrey et al., 2006). Tomando en consideración ambos estudios, se decidió eutanasiar a los corderos a las 48 horas postinoculación y a las ovejas adultas a las 65 horas postinoculación con el objetivo de detectar la fase de la infección en la que el prion hubiera sido ya captado por las células epiteliales del íleon y hubiera sido transferido a las células encargadas de su transporte hasta el tejido linfoide de las PP.

Para la inoculación vía oral de los corderos neonatos, se diseñaron los cruces reproductivos entre animales resistentes y susceptibles según su genotipo para el gen *Prnp* pertenecientes al rebaño del Centro de Encefalopatías y Enfermedades Emergentes Transmisibles ubicado en las instalaciones de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza. Para hacer referencia a los corderos que recibieron el inóculo positivo a scrapie se calificarán como del grupo de infectados y para referirnos a los corderos que recibieron el inóculo negativo como del grupo control. De este modo, el objetivo de dichos cruces reproductivos fue obtener los siguientes cuatro grupos de corderos: infectados con genotipo susceptible (IS, n=10), infectados con genotipo resistente (IR, n=4), controles con genotipo susceptible (CS, n=5) y controles con genotipo resistente (CR, n=4) para comparar la respuesta inmune temprana en el íleon inducida por la exposición al prion. Los 23 corderos que formaron parte del estudio se clasificaron en dos grupos, susceptibles o resistentes, según su genotipo atendiendo a su nivel de riesgo para la infección con scrapie (Tabla 10). De este modo los corderos con genotipos incluidos en los niveles de riesgo R3, R4 y R5 fueron clasificados como susceptibles, mientras que los incluidos en los niveles de riesgo R4 y R5 fueron clasificados como resistentes.

Tabla 10. Información sobre los corderos infectados vía oral con scrapie a las 48 horas de vida y eutanasiados a las 48 hora post-inoculación.

Nº de cordero	Genotipo	Nivel de riesgo	Grupo	Inóculo	Sexo
1	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	+	Macho
2	VRQ/ARR	R4	Susceptible	+	Hembra
3	VRQ/ARR	R4	Susceptible	+	Macho
4	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	+	Hembra
5	VRQ/ARR	R4	Susceptible	+	Hembra
6	ARQ/ARQ	R3	Susceptible	+	Macho
7	ARQ/ARQ	R3	Susceptible	+	Macho
8	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	+	Hembra
9	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	+	Hembra
10	ARQ/ARH	R3	Susceptible	+	Hembra
11	ARR/AHQ	R2	Resistente	+	Hembra
12	ARR/ARQ	R2	Resistente	+	Hembra
13	ARR/ARQ	R2	Resistente	+	Macho
14	ARR/ARQ	R2	Resistente	+	Hembra
15	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	-	Hembra
16	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	-	Macho
17	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	-	Hembra
18	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	-	Macho
19	VRQ/VRQ	R5	Susceptible	-	Hembra
20	ARR/ARQ	R2	Resistente	-	Macho
21	ARR/AHQ	R1	Resistente	-	Hembra
22	ARR/ARR	R1	Resistente	-	Hembra
23	ARR/ARR	R1	Resistente	-	Macho

El número de corderos que integraron cada grupo no fue tan homogéneo y numeroso como inicialmente se había previsto al diseñar los cruces reproductivos debido a problemas derivados del trabajo con animales neonatos. Hay que tener en cuenta que para garantizar la fertilidad de las ovejas y sincronizar los partos, se aplicaron tratamientos intravaginales con progesterona que hicieron que un alto porcentaje de las gestaciones fueran dobles. Como consecuencia, algunos corderos nacieron especialmente débiles y pequeños por lo que no pudieron ser inoculados, otros murieron a las pocas horas de nacer y algunos que llegaron a ser inoculados finalmente tuvieron que ser descartados al presentar lesiones digestivas incompatibles con el propósito del estudio. Sumado a ello, debido a que antes de la inoculación vía oral no había tiempo suficiente para realizar las técnicas necesarias para secuenciar el gen *Prnp* de los corderos, estos tuvieron que ser inoculados sin conocer su genotipo. Por ello, la decisión de administrar el inóculo positivo o negativo a scrapie dependía del genotipo de los progenitores, que en la mayoría de los casos eran heterocigotos para el gen *Prnp*.

Los corderos fueron inoculados vía oral con una dosis de 1 g (equivalente a 2 ml) a las 48 horas de vida y fueron eutanasiados a las 48 horas postinoculación con pentobarbital sódico vía intravenosa (Figura 19). Tras su eutanasia se tomaron muestras de todos los tramos intestinales, de varios linfonodos mesentéricos, del linfonodo retrofaríngeo y de las amígdalas en RNAlater, formaldehido tamponado al 10% y para congelar (sin ningún medio de conservación).

Figura 19. Fotografía tomada durante el procedimiento de inoculación vía oral de un cordero a las 48 horas de vida.

Para el estudio de la respuesta inmune temprana en el íleon ante la exposición al prion vía oral en ovejas adultas y sanas, se seleccionaron 28 ovejas procedentes de dos explotaciones ovinas de Aragón (en las que no se habían declarado casos de scrapie). Para la selección de esas 28 ovejas, se tomaron muestras de sangre de 60 ovejas de entre 3 y 7 años, con buena condición corporal, no gestantes y sin patologías aparentes para determinar su genotipo para el gen *Prnp*. Conocido su genotipo, se clasificaron de igual modo que los corderos en los siguientes cuatro grupos: infectadas con genotipo resistente (IR, n=7), infectadas con genotipo susceptible (IS, n=7), controles con genotipo resistente (CR, n=7) y controles con genotipo susceptible (CS, n=7) (Tabla 11). Más tarde una oveja del grupo CS tuvo que ser descartada del estudio al detectar lesiones en el intestino delgado durante la necropsia que podrían interferir con los resultados.

Todas las ovejas fueron inoculadas vía oral con los mismos homogeneizados de encéfalos que se utilizaron en el estudio en corderos, pero en este caso la dosis fue de 5 g (equivalentes a 10 ml) y el periodo entre la inoculación y la eutanasia (con pentobarbital sódico vía intravenosa) fue de 65 horas. Se tomaron muestras de todos los tramos intestinales, de varios linfonodos mesentéricos, del linfonodo retrofaríngeo y de las amígdalas en RNAlater, formaldehído tamponado al 10% y para congelar (sin ningún medio de conservación). Además, se tomó una muestra del obex de todas las ovejas para detectar la presencia o ausencia de PrP^{Sc} en el SNC mediante un ensayo inmunoenzimáticos como previamente se ha explicado.

Tabla 11. Información sobre las ovejas infectadas vía oral con scrapie y eutanasiadas a las 65 horas post-inoculación.

Nº oveja	Genotipo	Grupo	Nivel de riesgo	Inóculo	Sexo	Edad (años)
1	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	5
2	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	4
3	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	4
4	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	3
5	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	3
6	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	4
7	ARR/ARQ	Resistente	R2	+	Hembra	4
8	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Hembra	4
9	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Hembra	4
10	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Hembra	5
11	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Hembra	5
12	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Hembra	7
13	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Hembra	7
14	ARR/ARQ	Resistente	R2	-	Macho	4
15	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	+	Hembra	5
16	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	+	Hembra	5
17	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	+	Hembra	4
18	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	+	Hembra	3
19	VRQ/ARQ	Susceptible	R5	+	Hembra	5
20	VRQ/ARQ	Susceptible	R5	+	Macho	4
21	VRQ/ARQ	Susceptible	R5	+	Macho	3
22	ARQ/VRQ	Susceptible	R5	-	Hembra	5
23	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	-	Hembra	4
24	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	-	Hembra	4
25	ARQ/ARQ	Susceptible	R3	-	Hembra	5
26	VRQ/ARQ	Susceptible	R1	-	Hembra	4
27*	VRQ/ARQ	Susceptible	R1	-	Hembra	3
28	VRQ/ARQ	Susceptible	R1	-	Hembra	3

***Oveja descarta del estudio por los hallazgos anatomopatológicos detectados en la necropsia.

Declaración ética

Todos los procedimientos empleados en este estudio cumplen los principio éticos y de protección animal para la experimentación que ha establecido la Universidad de Zaragoza y se adaptan a la normativa vigente (R.D. 53/2013).Además, los procedimientos fueron aprobados por la Comisión Ética Asesora para la Experimentación Animal con código de identificación PI29/17.

8. Análisis estadístico y representación gráfica

Todos los resultados obtenidos fueron registrados digitalmente en una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 2010 para su posterior análisis con el paquete estadístico SPSS (IMB, SPSS Statistiscs, vs24) para Windows. Para evaluar si los datos recogidos presentaban una distribución normal fueron analizados con el test de Shapiro-Wilk W. Si la variable presentaba una distribución normal, se utilizaron métodos estadísticos paramétricos para comparar las medias: test de Student para comparar dos grupos independientes o ANOVA de 1 vía para comparar más de dos grupos independientes. Para analizar la igualdad de la varianza de cada variable se utilizó la prueba de Levene. En los casos en los que el estadístico de ANOVA fue significativo, como análisis a posteriori se compararon todas las posibles combinaciones por parejas realizando el test de Student ajustando por Bonferroni. Para las variables que presentaban una distribución no normal

se utilizaron pruebas no paramétricas para comparar las medianas: U de Mann-Whitney para comparar dos grupos independientes o Kruskal-Wallis para más de dos grupos independientes. En todos los análisis realizados se consideró un nivel de confianza del 95% (riesgo del 5%) por lo que las diferencias estadísticas se consideraron significativas para un valor de $p<0.05$.

Los resultados fueron representados en gráficos de barras o líneas utilizando el programa GraphPad Prism versión 6.0.

RESULTADOS

Estudio 1: Análisis de los TLR en el sistema nervioso central de ovejas infectadas con scrapie de forma natural y comparación con el modelo murino

1.1. Neuropatología asociada al scrapie.

Inicialmente, para confirmar y caracterizar la neuropatología comúnmente asociada a las enfermedades priónicas en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie incluidas en este estudio, se examinó la espongiosis, los depósitos de PrP^{Sc} y la gliosis reactiva en cuatro regiones del SNC: médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf). En las ovejas scrapie negativas no se detectaron signos de espongiosis, depósitos de PrP^{Sc} o indicios de una gliosis reactiva en ninguna región del SNC. Por el contrario, en el SNC de las ovejas infectadas con scrapie se observaron todas las características histopatológicas de las enfermedades priónicas aunque su severidad variaba según la región analizada siendo significativamente mayor en la médula oblongada y tálamo respecto al hipocampo y la corteza frontal (Figura 20). Así, el grado más alto de espongiosis fue detectado en la médula oblongada y en el tálamo de las ovejas infectadas, tanto en fase clínica avanzada como incipiente, mientras que en el hipocampo y en la corteza frontal el número de vacuolas era escaso incluso en las ovejas con clínica avanzada (Figura 21. A, C). El patrón de vacuolización también variaba según la región del SNC, siendo predominantemente intraneuronal en la médula oblongada y asociado al neuropilo en el tálamo y la corteza frontal. En el caso del hipocampo las pocas vacuolas que se observaron fueron en su mayoría intraneuronales.

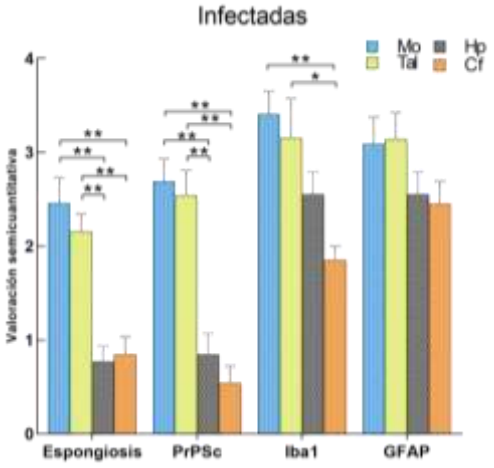


Figura 20. Representación gráfica del grado de espongiosis, depósitos de PrP^{Sc}, microglioisis y astrogliosis en las 4 regiones del sistema nervioso central (SNC) de las ovejas infectadas con scrapie de forma natural (tanto en fase clínica avanzada como incipiente): médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf). *p<0.05, **p<0.01

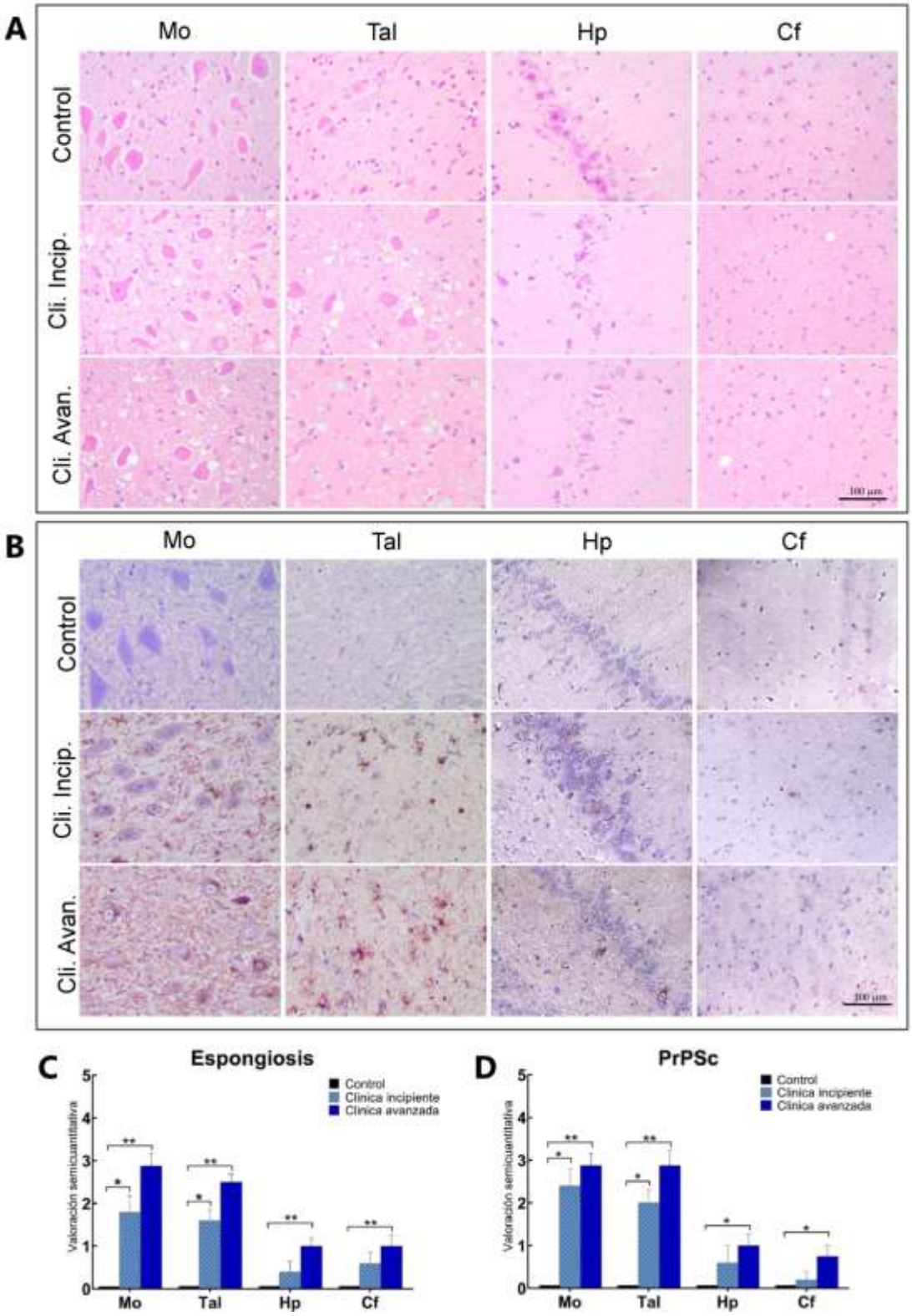


Figura 21. Imágenes representativas de la espongiosis y los depósitos de PrP^{Sc} en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) y su valoración semicuantitativa (de 0 a 5) en las ovejas control e infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica incipiente (Cli. Incip.) y avanzada (Cli. Avan.) **(A)** Tinción de hematoxilina-eosina (HE) para el análisis histopatológico del grado de espongiosis. **(B)** Inmunohisotquímica para la detección de la PrP^{Sc} con el anticuerpo L42. **(C)** Gráfico representativo de la valoración semicuantitativa de la espongiosis y su análisis estadístico. **(D)** Gráfico representativo de la valoración semicuantitativa de los depósitos de PrP^{Sc}. *p<0.05, **p<0.01.

La acumulación de PrP^{Sc} en las ovejas infectadas con scrapie se evaluó tanto por IHQ como por WB. Además, los depósitos de PrP^{Sc} fueron clasificados en cuatro tipos previamente descritos (Jeffrey & Gonzalez, 2007) y evaluados semicuantitativamente según fueran intracelulares: intraneuronal o intraglial (incluyendo intraastrocítico e intramicroglial), o extracelulares/asociados a la membrana celular: asociados al neuropilo o asociados a células gliales. Los análisis inmunohistoquímicos mostraron que la cantidad de depósitos de PrP^{Sc} detectados en la médula oblongada y tálamo de las ovejas infectadas, tanto en fase clínica avanzada como incipiente, eran significativamente mayores a los detectados en el hipocampo y corteza frontal (Figura 21. B, D). Además, también mostraron que el patrón intraneuronal y asociado al neuropilo predominaba en todas las regiones analizadas, mientras que el patrón intraglial y asociado a células gliales era escaso o incluso nulo en la corteza frontal y el hipocampo respecto a la médula oblongada y tálamo (Figura 22).

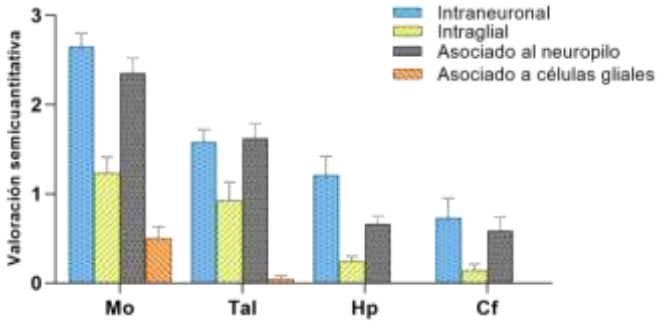


Figura 22. Tipos de depósitos de PrP^{Sc} y su magnitud evaluada de 0 (ausente) a 3 (severa) en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie.

Paralelamente, los resultados de los WB revelaron el patrón de bandas característico del scrapie clásico, es decir, las tres bandas correspondientes con las diferentes glicoformas de la PrP^{Sc} (Figura 23): dos bandas superiores situadas entre los 27-30 kDa, que corresponden con la banda diglicosilada en la parte más alta y la monoglicosilada en el medio, y una banda en la parte inferior que corresponde con la no glicosilada. La banda no glicosilada presentó un peso molecular de aproximadamente 19 kDa en todas las muestras analizadas.

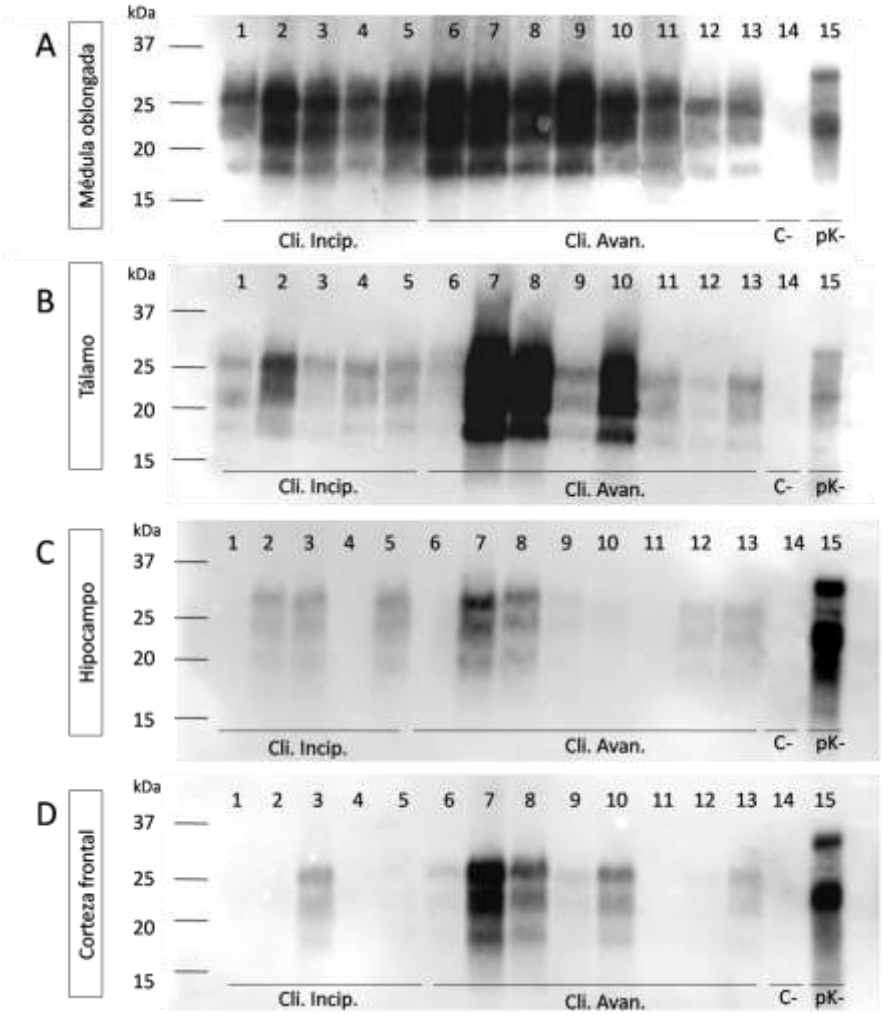


Figura 23. Western blot para la detección de la PrP^{Sc} utilizando como anticuerpo primario SHA31 en la médula oblongada **(A),** tálamo **(B),** hipocampo **(C)** y corteza frontal **(D)** en las 13 ovejas infectadas de forma natural con scrapie. Las muestras 1-5 corresponden con las ovejas en fase clínica incipiente y las muestras 6-13 con las ovejas en fase clínica avanzada. De las muestras 1-13 se analizó la misma cantidad de proteína. La línea 14 muestra un control negativo y la línea 15 un control con un homogeneizado de encéfalo sin digerir con PK. El peso molecular se representa a la izquierda en kilodaltons (kDa).

Al comparar los resultados obtenidos por IHQ y WB se comprobó que todas las ovejas infectadas con scrapie en fase clínica avanzada mostraron depósitos de PrP^{Sc} por IHQ en las cuatro regiones analizadas del SNC pero por WB dos de ellas fueron negativas en el hipocampo y una en la corteza frontal. Asimismo, todas las ovejas infectadas en fase clínica incipiente fueron positivas por IHQ en la médula oblongada, tálamo e hipocampo mientras que en la corteza frontal tres fueron negativas. Por WB todas las ovejas con clínica inicipiente fueron positivas en la médula oblongada y tálamo pero dos fueron negativas en el hipocampo y tres en la corteza frontal. Por tanto, los resultados IHQ y de WB mostraron un patrón de PrP^{Sc} decreciente considerando la cantidad y el número de ovejas positivas, siendo mayor en la médula oblongada y tálamo respecto al hipocampo y corteza frontal (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados de la detección de la PrP^{Sc} mediante inmunohistoquímica (IHQ) o western blot (WB) en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie.

			Mo		Tal		Hp		Cf	
	ID	Fase clínica	IHQ	WB	IHQ	WB	IHQ	WB	IHQ	WB
Grupo ovejas infectadas	1	Incipiente	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	Incipiente	+	+	+	+	+	+	-	-
	4	Incipiente	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	Incipiente	+	+	+	+	+	-	-	-
	6	Incipiente	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	Avnazada	+	+	+	+	+	+	+	+
	13	Avanzada	+	+	+	+	+	-	+	+
	14	Avnazada	+	+	+	+	+	+	+	+
	15	Avnazada	+	+	+	+	+	+	+	+
	16	Avnazada	+	+	+	+	+	+	+	+
	17	Avnazada	+	+	+	+	+	+	+	+
	18	Avnazada	+	+	+	+	+	-	+	-
	19	Avnazada	+	+	+	+	+	+	+	+

Para evaluar la respuesta neuroinflamatoria, caracterizada principalmente por la activación de la microglía y la astroglía, se analizó por IHQ el marcador microglial Iba1 y el marcador astroglial GFAP. Estos marcadores permiten analizar dos factores esenciales para determinar si hay o no activación glial, la intensidad de la inmunotinción y la morfología de la microglía y astroglía. De este modo, el incremento significativo ($p<0.01$) en la inmunotinción con Iba 1 en todas las regiones analizadas de las ovejas infectadas con scrapie, tanto en fase clínica avanzada como incipiente, evidenció una microgliosis reactiva respecto a las ovejas control (Figura 24. A, C). Paralelamente, el análisis de las características morfológicas observadas en las células microgliales de las ovejas infectadas y control llevó a la detección de tres tipos principales de células microgliales: ramificadas, hipertróficas y ameboides. La microglía ramificada, conocida también como microglía en reposo y caracterizada por tener un cuerpo celular pequeño y ramificaciones finas, fue la única detectada en las ovejas control. La microglía ameboide, con un cuerpo celular redondeado y sin ramificaciones, fue la predominante en la médula oblongada de las ovejas infectadas con scrapie. En el tálamo, aunque también se detectaron células microgliales ameboides, predominaba la morfología hipertrófica, caracterizada por tener un cuerpo celular grande, con ramificaciones cortas y gruesas. En el hipocampo y en la corteza frontal también era mayoritaria la microglía hipertrófica y prácticamente no se detectó microglía ambeoide.

La inmunotinción de la GFAP mostró una astrogliosis reactiva en la médula oblongada, tálamo y corteza frontal de las ovejas infectadas en fase clínica avanzada respecto a las ovejas control, pero no en las ovejas en fase clínica incipiente. Por el contrario, en el hipocampo de las ovejas infectadas en fase clínica incipiente la astrogliosis fue más severa que en las ovejas en fase clínica avanzada (Figura 24. B, D). El análisis de las características morfológicas astrogliales evidenció dos tipos de astrocitos según el grupo de ovejas estudiado; en el caso de las ovejas control, los astrocitos presentaban una morfología estrellada normal, caracterizada por sus ramificaciones largas y finas, mientras que en las ovejas infectadas la morfología astroglial presentaba características patológicas como la hipertrofia de su cuerpo celular y de sus ramificaciones. En la médula oblongada y tálamo de las ovejas infectadas, además la hipertrofia astroglial, se observó la superposición de las ramificaciones de los astrocitos, signo de astrogliosis reactiva severa. En contraposición, la hipertrofia del cuerpo celular y las ramificaciones de los astrocitos era menor en el hipocampo y en la corteza frontal, reflejando una astrogliosis más moderada.

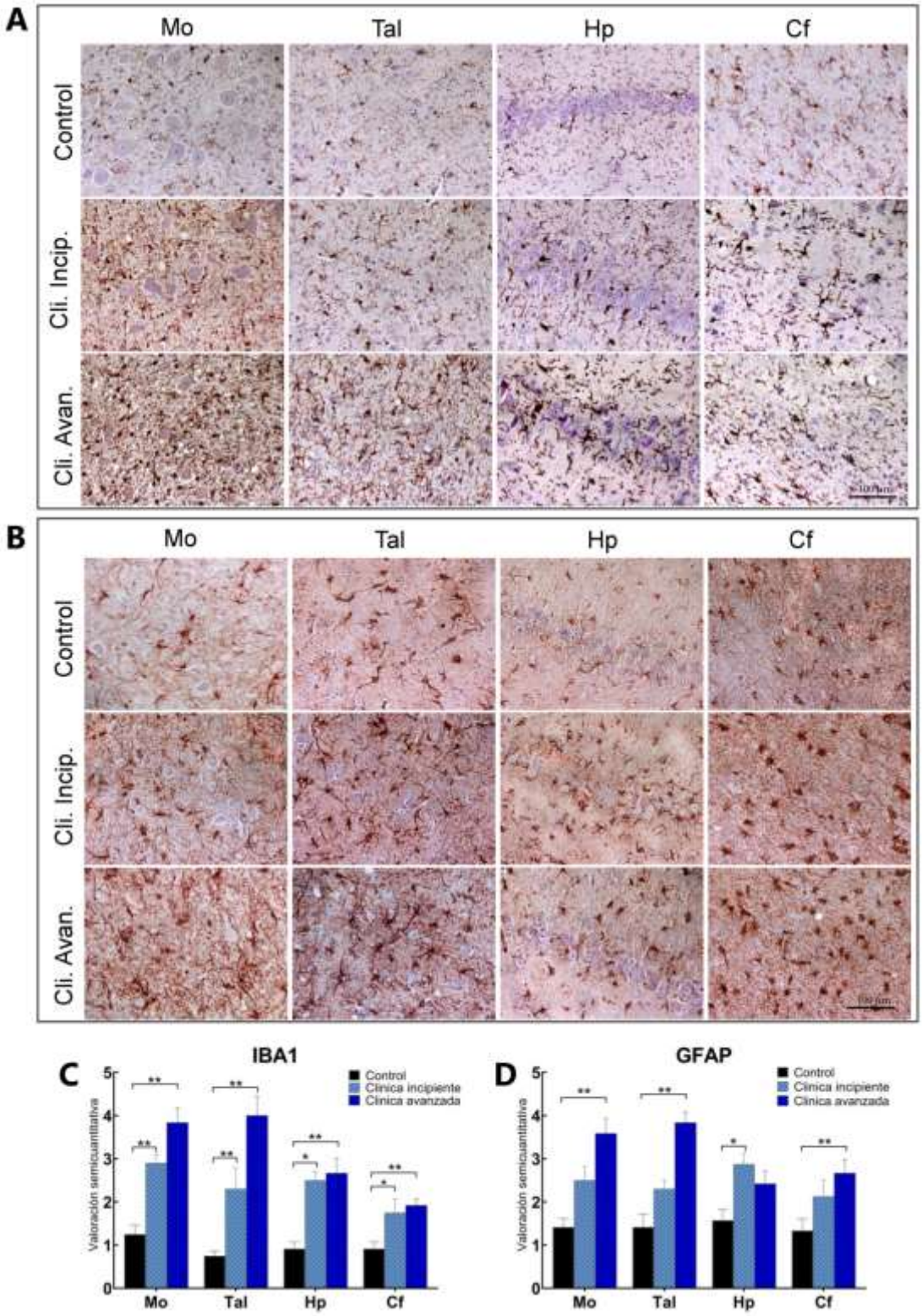


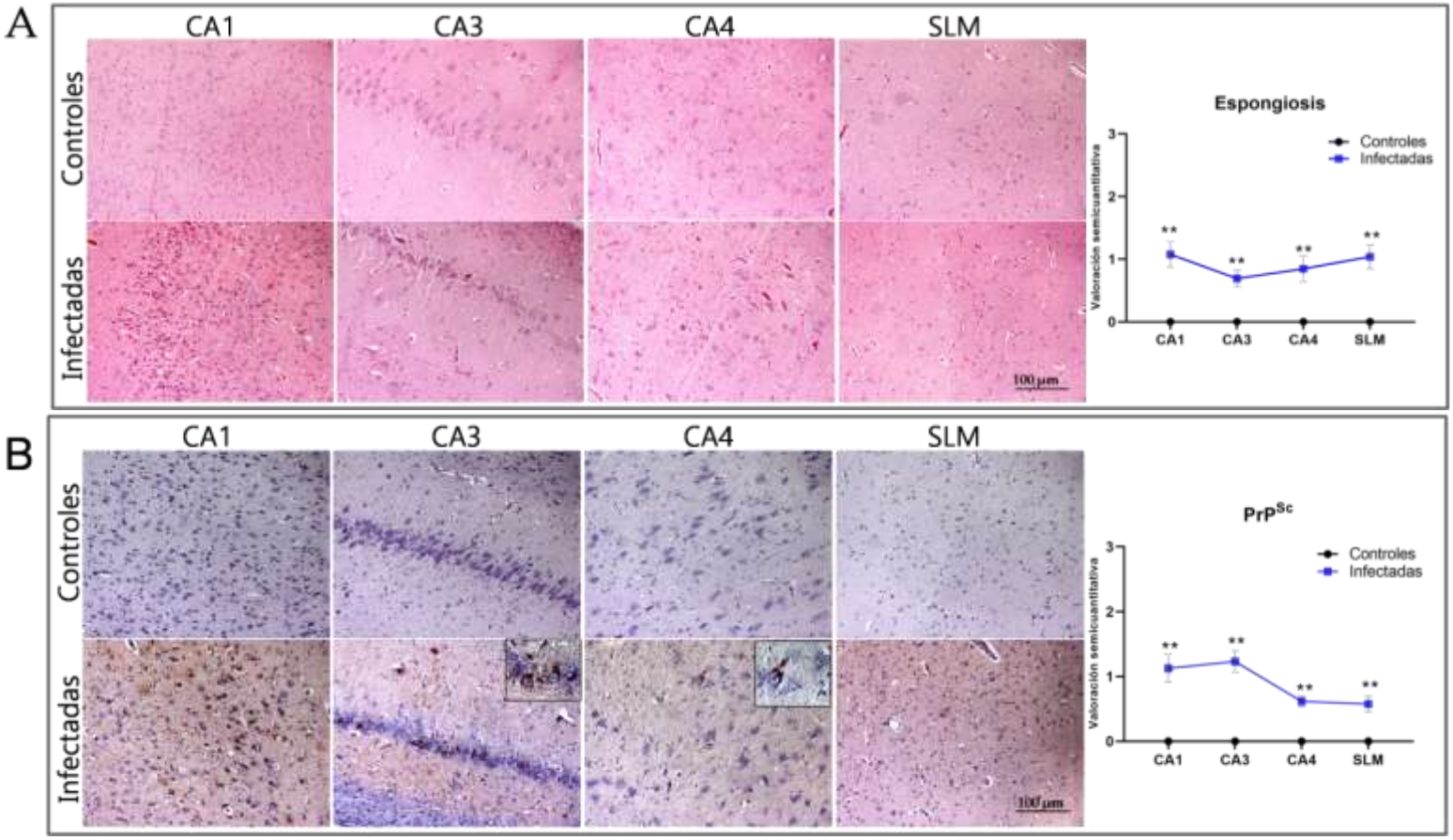
Figura 24. Imágenes representativas de la microgliosis y la astrogliosis en la médula oblongada (Mo), tálamo (Tal), hipocampo (Hp) y corteza frontal (Cf) y su valoración semicuantitativa (de 0 a 5) en las ovejas control e infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica incipiente (Cli. Incip.) y avanzada (Cli. Avan.) **(A)** Inmunotinción de la molécula adaptadora de unión al calcio (Iba1) para el análisis de la reactividad microglial. **(B)** Inmunotinción de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para el estudio de la activación astroglial. **(C)** Gráfico representativo de la valoración semicuantitativa de la microgliosis y su análisis estadístico. **(D)** Gráfico representativo de la valoración semicuantitativa de la astrogliosis. *p<0.05, **p<0.01.

Considerando globalmente los resultados de las características neuropatológicas estudiadas en las cuatro regiones del SNC de las ovejas infectadas con scrapie, se aprecia que la severidad de las lesiones disminuye en sentido caudo-rostral, es decir, de la médula oblongada hacia la corteza frontal. Este patrón caudo-rostral resulta lógico teniendo en cuenta que el prion sigue el mismo patrón de neuroinvasión. Sin embargo, la disminución no es gradual en todas las características neuropatológicas y, mientras la microgliosis y la astrogliosis sí se reducen progresivamente en dirección rostral, la espongiosis y los depósitos de PrP^{Sc} no, especialmente al comparar el tálamo y el hipocampo (Figura 20). Esta diferencia resulta llamativa ya que el tálamo y el hipocampo son dos regiones anatómicamente próximas entre sí. Además, el hipocampo mantiene conexiones nerviosas de tipo aferente y eferente no solo con el tálamo, sino también con otras regiones que presentan un alto grado lesional, como son el hipotálamo y la formación reticular que se extiende a lo largo del tronco del encéfalo. Algunos estudios recientes sobre las enfermedades priónicas sugieren que las distintas regiones del encéfalo presentan una vulnerabilidad diferente a la neurodegeneración causada por el prion debido a las diferencias fenotípicas en sus componentes celulares (Alibhai et al., 2016; Makarava, Chang, & Baskakov, 2020; Makarava et al., 2019). Concretamente, tanto en pacientes humanos con CJD (Kaneko et al., 2008; Masullo & Macchi, 1997) como en modelos murinos infectados con scrapie (Majer et al., 2012), se han descrito ciertas discrepancias entre el grado de neurodegeneración general hallada en el SNC y el daño neuronal, la acumulación de PrP^{Sc} y la espongiosis detectadas en el hipocampo. Teniendo en cuenta estos estudios y nuestras observaciones, se decidió realizar un análisis en profundidad del hipocampo.

1.2. Hallazgos patológicos en el hipocampo de las ovejas infectadas con scrapie.

Para el estudio del hipocampo se analizaron las mismas características neuropatológicas (espongiosis, depósitos de PrP^{Sc}, microgliosis y astrogliosis) en cuatro regiones: la capa piramidal del *cornus ammonis* (CA)1, CA3, CA4 y el *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) (Figura 25). En este caso, las ovejas infectadas fueron evaluadas como un único grupo independientemente de su fase clínica ya que no se observaron diferencias en la neuropatología del hipocampo entre las ovejas con clínica avanzada e incipiente, tal y como ha mostrado en el apartado anterior (Figura 20 y 21).

El escaso número de vacuolas detectado en las regiones CA1, CA3, CA4 y SLM evidenció una degeneración espongiforme leve en el hipocampo de las ovejas infectadas (Figura 25. A). Sin embargo, la escasa pérdida neuronal contrastaba con los depósitos focalmente intensos de PrP^{Sc} detectados en algunos segmentos de la capa piramidal CA1 y CA3, mientras que en la región CA4 y SLM los depósitos fueron más leves y dispersos (Figura 25. B).


A
CA1
CA3
CA4
SLM
Controles
Infectadas
100 µm
Espongiosis
Controles
Infectadas
Valoración semicuantitativa
0
1
2
3
**
CA1
CA3
CA4
SLM
B
CA1
CA3
CA4
SLM
Controles
Infectadas
100 µm
PrPSc
Controles
Infectadas
Valoración semicuantitativa
0
1
2
3
**
CA1
CA3
CA4
SLM

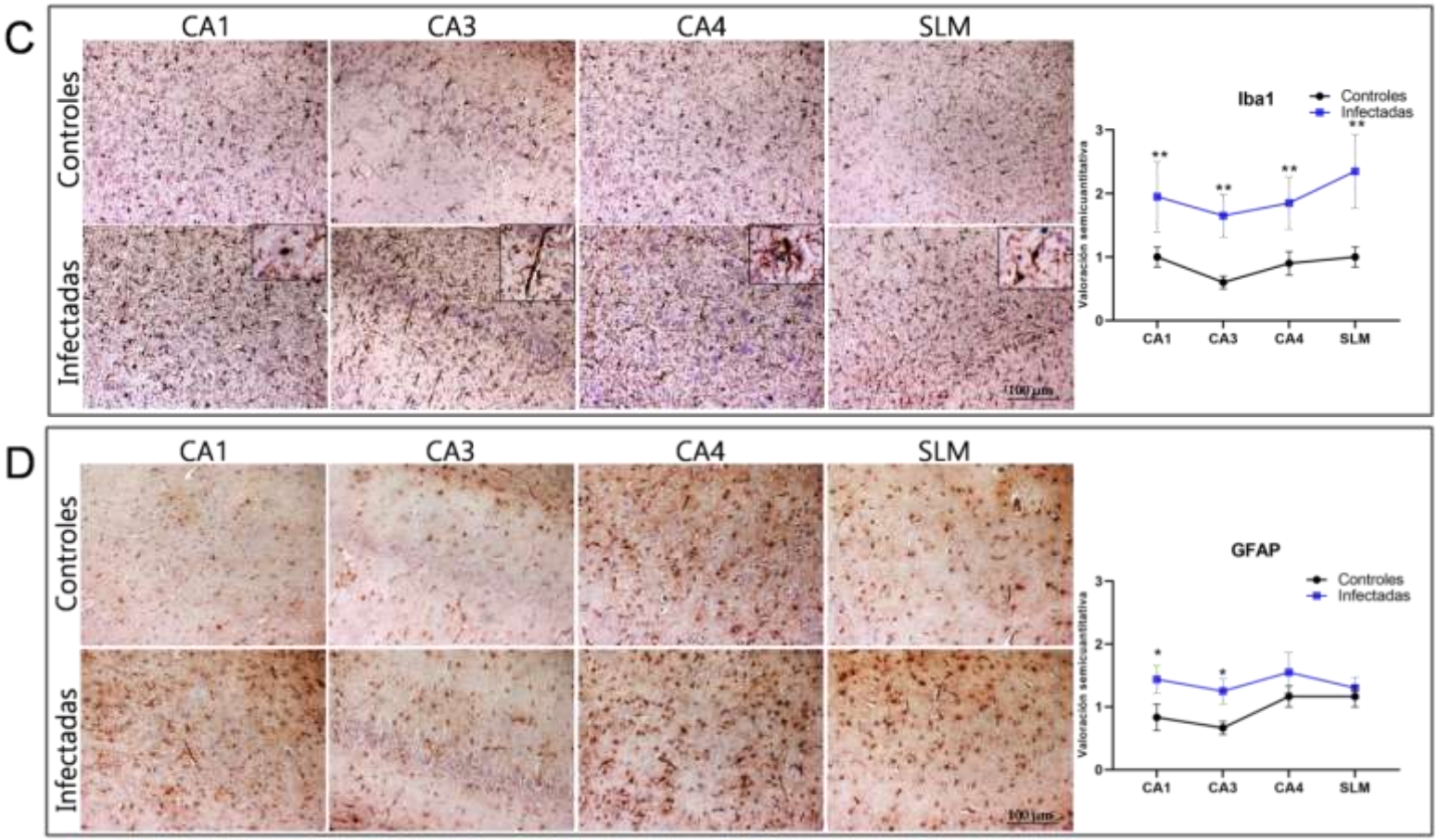


Figura 25. Imágenes representativas de la neuropatología del hipocampoy la valoración semicuantitativa (de 0 a 5) de la espongiosis, los depósitos de PrP^{Sc}, la microgliosis y la astrogliosis en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y controles en la capa piramidal del *cornu amonis* (CA) 1, CA3, CA4 y en el *stratum lacunosum-moleculare* (SLM). **(A)** Tinción de hematoxilina-eosina para el análisis histopatológico del grado de espongiosis. **(B)** Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc} con el anticuerpo L42. **(C)** Inmunomarcaje de la molécula adaptadora de unión al calcio (Iba1) para el análisis de la respuesta microglial. **(D)** Inmunomarcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) para el estudio de la activación astroglial. Los gráficos muestran los resultados de la valoración semicuantitativa de cada parámetro evaluado. *p<0.05, **p<0.01.

También se observaron diferencias en el patrón de los depósitos de PrP^{Sc} entre las regiones del hipocampo siendo principalmente intraneuronales y asociados al neuropilo en las regiones CA1, CA3 y CA4, e intragliales y asociados al neuropilo en el SLM (Figura 26).

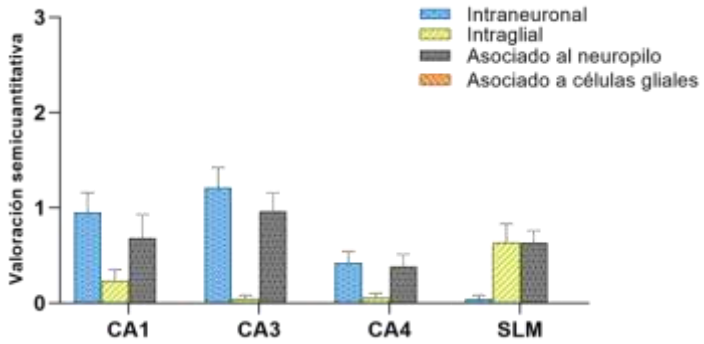


Figura 26. Tipos de depósitos de PrP^{Sc} y su magnitud, evaluada de 0 (ausente) a 3 (severa), en el *cornu amonis* (CA) 1, CA3, CA4 y en el *stratum lacunosum-moleculare* (SLM) en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie.

La inmunotinción de Iba1 en el hipocampo de las ovejas control confirmó la presencia de células microgliales ramificadas, es decir, no reactivas, distribuidas uniformemente por las regiones CA1, CA3, CA4 y SLM (Figura 25. C). En cambio, en las ovejas infectadas se detectó una microgliosis reactiva caracterizada por el incremento en la intensidad de Iba1 y cambios en la morfología microglial. Las características morfológicas de las células microgliales de las ovejas infectadas diferían según la región del hipocampo analizada. Así, en la región CA1 y del SLM la microglía presentaba una morfología hipertrófica, con un cuerpo celular agrandado y ramificaciones cortas y escasas. En la región CA4 también predominaba la morfología hipertrófica aunque en este caso las células microgliales estaban más ramificadas. Pero el hallazgo más relevante se observó en la capa piramidal CA3 de tres ovejas en fase clínica incipiente donde se detectaron células microgliales dispuestas perpendicularmente a la capa de neuronas piramidales, con un cuerpo celular alargado y un proceso primario que se extendía de extremo a extremo de la célula (Figura 27). Este tipo de morfología microglial, conocida como microglía en bastón, supone la primera descripción en la enfermedad del scrapie.

Por último, la inmunotinión de la GFAP mostró un leve incremento en su intensidad en la región CA1 y CA3 en las ovejas infectadas con scrapie respecto a las ovejas control atribuible a la ligera hipertrofia del cuerpo celular de sus astrocitos. Este incremento de la astrogliosis reactiva en CA1 y CA3 coincidió con las regiones donde los depósitos de PrP^{Sc} intraneuronal y asociados al neuropilo fueron más intensos. Por el contrario, en la región CA4 y en el SLM no se encontraron diferencias entre las ovejas infectadas y control (Figura 25. D).

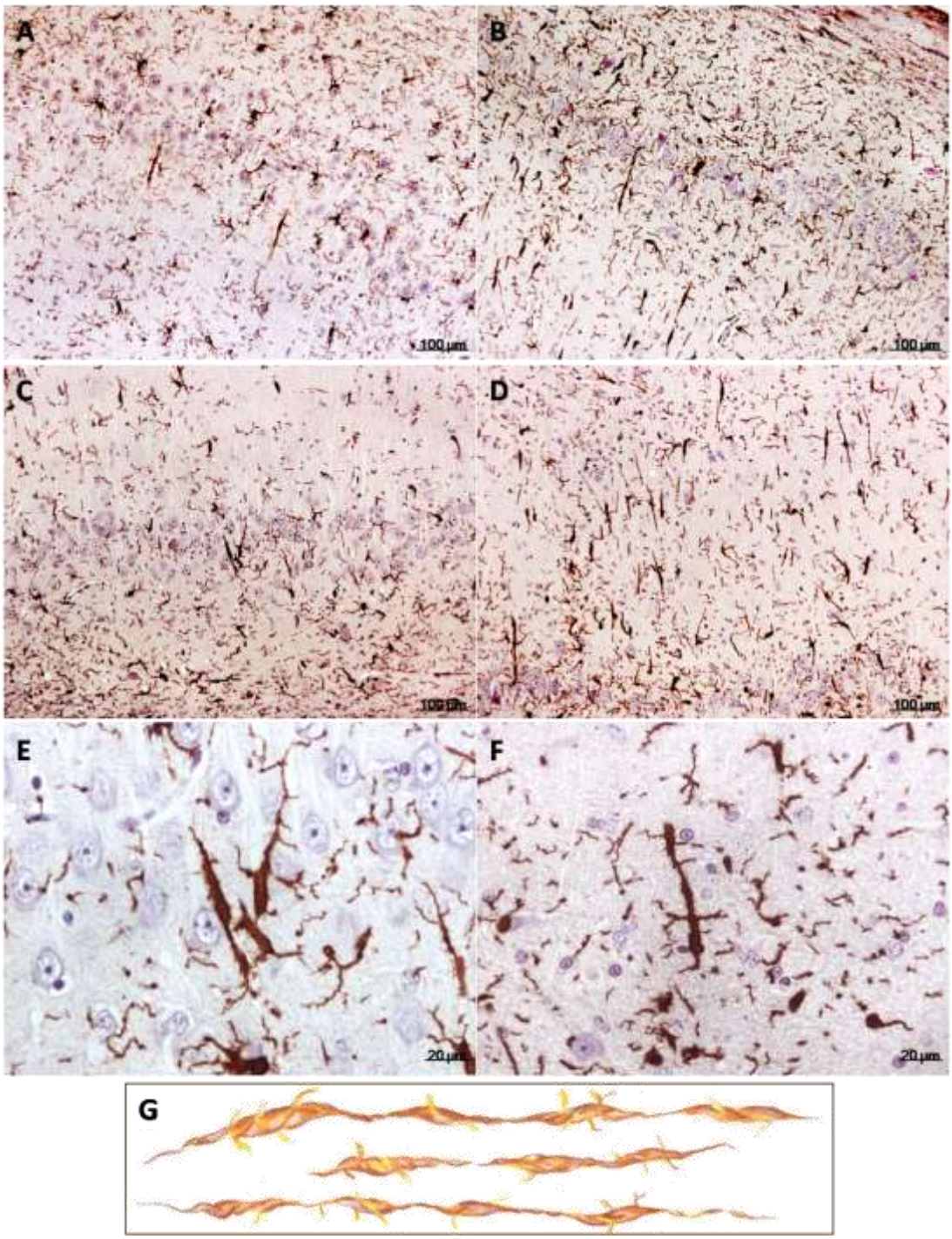


Figura 27. Microglía en bastón detectada mediante la inmunotinción de la molécula adaptadora de unión al calcio (Iba1). **(A-F)** Capa piramidal de la región del *cornus amonis 3* del hipocampo de tres ovejas con clínica incipiente (ovejas número 1, 4 y 5) e infectadas de forma natural con scrapie. **(G)** Representación de la microglía en bastón extraída del estudio de Giordano y colaboradores caracterizada por su morfología alargada debido a la retracción de sus procesos y a su cuerpo celular retorcido (Giordano et al., 2021).

1.3. Cambios en la expresión génica de los *TLR* y otros genes relacionados con la respuesta inmunitaria e inflamatoria.

Tras evaluar las principales características neuropatológicas en la médula oblongada, tálamo, hipocampo y corteza frontal en las ovejas infectadas de forma natural con scrapie, se analizó la expresión génica de veinte genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata que incluyen: los diez tipos de *TLR* ovinos, dos genes asociados con la cascada de activación intracelular de los TLR (*MyD88* y *Trif*), un gen relacionado con la inhibición de la respuesta de los TLR (*Tollip*), dos receptores que colaboran con los TLR en la detección de ciertos tipos de ligandos (*CD36* y *CD14*) y un marcador microglial (*CD68*) (Figura 28). La representación de los valores ΔCt calculados para estos genes en las cuatro regiones analizadas en las ovejas infectadas y control se adjunta en el anexo 1. En el caso del hipocampo y el tálamo, dadas las diferencias histopatológicas observadas, se analizó también la expresión de cuatro citoquinas relacionadas con la respuesta neuroinflamatoria de las enfermedades priónicas, dos citoquinas antiinflamatorias (*TGFβ* e *IL10*) y dos proinflamatorias (*TNFα* e *IL6*) (Figura 29) para comparar el carácter inflamatorio de la respuesta inmune en ambas regiones.

El análisis de los niveles de expresión génica en las cuatro regiones del SNC mostró que el número de genes con cambios significativos disminuía en sentido caudo-rostral, de acuerdo con el patrón neuropatológico descrito anteriormente. De este modo, la médula oblongada de las ovejas infectadas, la región más caudal y con lesiones más severas, fue también la que presentó mayor número de genes con la expresión aumentada. En cambio, en la corteza frontal, la región con menor grado de lesiones, solo se detectaron dos genes con la expresión aumentada. En concreto, en la médula oblongada de las ovejas infectadas se detectó un aumento significativo ($p<0.05$) de la expresión del *TLR1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, CD36* y *CD68* comparado con las ovejas control (Figura 28. A). En el tálamo, el incremento del *TLR4, 6, MyD88, CD36 y CD68* también fue estadísticamente significativo ($p<0.05$) en las ovejas con scrapie (Figura 28. B). En la corteza frontal, solo el aumento en la expresión del *TLR4* ($p<0.05$) en las ovejas infectadas con clínica y la disminución de *CD14* ($p<0.01$) en las ovejas con clínica incipiente fue estadísticamente significativa (Figura 28. D). Todos estos resultados contrastan con la disminución de la expresión del *TLR1, 2 y CD14* ($p<0.05$) en el hipocampo de las ovejas con scrapie respecto al grupo control (Figura 28. C). De cualquier modo, en general, en cuanto a los 10 *TLR* analizados destaca el incremento en la expresión del *TLR4* en todas las regiones analizadas en las ovejas infectadas con scrapie, a pesar de que en el hipocampo ese incremento no llegue a ser estadísticamente significativo.

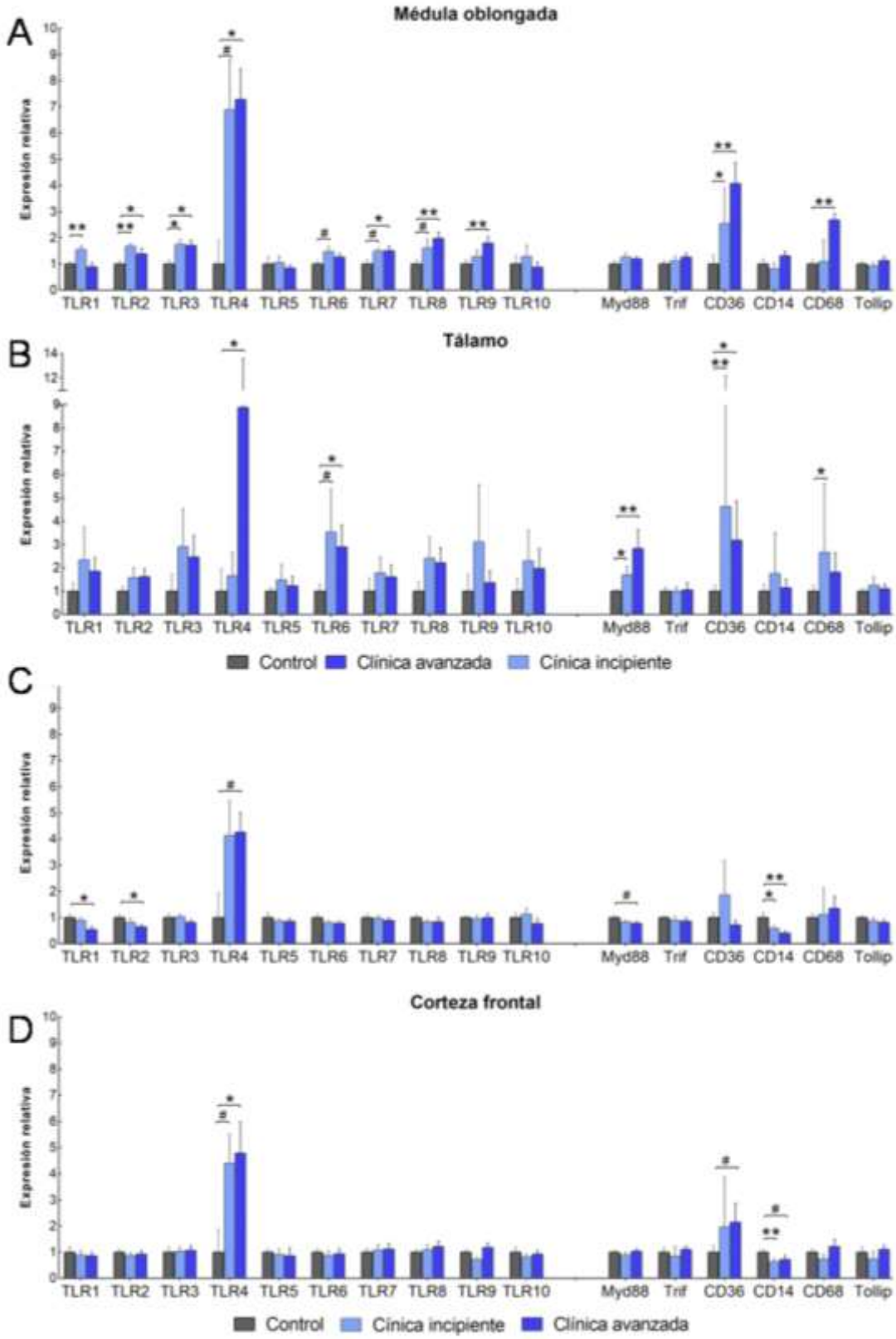


Figura 28. Expresión génica relativa de los *TLR 1-10*, *MyD88, Trif, CD36, CD14* y *Tollip* en la médula oblongada **(A),** tálamo **(B)**, hipocampo **(C)** y corteza frontal **(D)** de las ovejas infectadas con scrapie en en fase clínica avanzada e incipiente respecto a las ovejas control (los controles están estandarizados al valor 1). # $p<0.1$, *$p<0.05$, **$p<0.01$.

Por otro lado, el análisis de la expresión génica de las citoquinas en el tálamo e hipocampo mostró un incremento significativo de *TGFß, IL10, TNFα e IL6* en el tálamo de las ovejas infectadas en fase clínica incipiente y un aumento próximo a la significancia *TGFß e IL10* en las ovejas en fase clínica avanzada respecto a las ovejas control. En cambio, en el hipocampo no se detectaron alteraciones en los niveles de expresión génica en ninguna de las citoquinas analizadas (Figura 29).

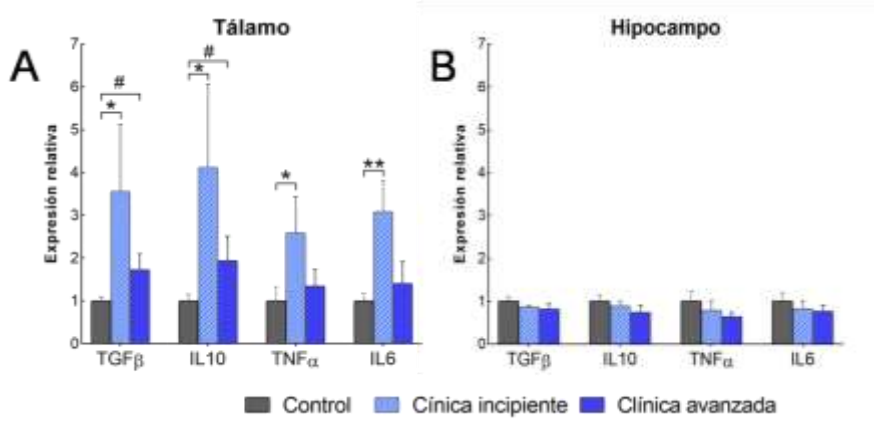


Figura 29. Expresión génica relativa de las citoquinas antiinflamatorias (*TGFß* e *IL10*) y proinflamatorias (*TNFα* e *IL6*) en el tálamo **(A)** e hipocampo **(B)** de las ovejas infectadas en fase clínica incipiente y avanzada con scrapie respecto a las ovejas control (los controles están estandarizados al valor 1). # $p<0.1$, *$p<0.05$, **$p<0.01$.

1.4. Detección de la proteína TLR4 en el SNC.

El aumento en la transcripción génica no siempre está asociado con un aumento en los niveles proteicos debido a mecanismos reguladores de la traducción y síntesis proteica. Por tanto, para confirmar que el incremento en la expresión génica del *TLR4* se traduce en un incremento de sus niveles proteicos, se analizó mediante WB los niveles proteicos del TLR4 relativos a la β-actina en todas las regiones nerviosas de cuatro ovejas infectadas en fase clínica avanzada y control (Figura 30). Los resultados corroboraron el aumento estadísticamente significativo ($p<0.05$) del TLR4 en las cuatro regiones de las ovejas infectadas frente al grupo control. Este resultado resulta relevante puesto que hasta la fecha es la primera vez que se describe un aumento en los niveles proteicos del TLR4 en las enfermedades priónicas pese a ser uno de los TLR más estudiados en otras enfermedades neurodegenerativas humanas.

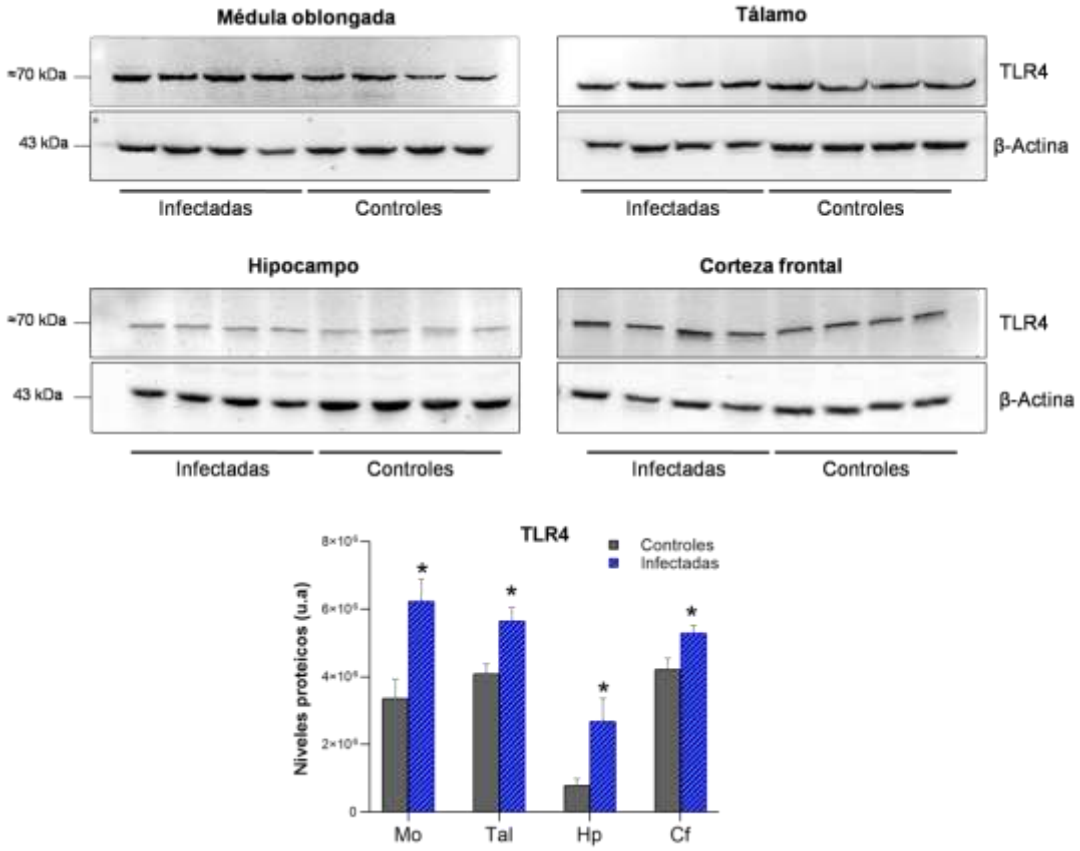


Figura 30. Niveles proteicos del TLR4 relativos a la β-actina en la médula oblongada, tálamo, hipocampo y corteza frontal en ovejas infectadas de forma natural con scrapie en fase clínica avanzada (n=4) y control (n=4). El gráfico muestra los resultados de la densitometría de las bandas y su análisis estadístico. *p<0.05.

1.5. Características patológicas en el diencéfalo de ratones tg338 infectados vía intracraneal con scrapie.

Actualmente existen varios modelos transgénicos murinos para el estudio de las enfermedades priónicas que expresan la PrP^{C} de diversas especies y que desarrollan con bastante eficacia la neuropatología descrita en las enfermedades priónicas humanas y animales. Uno de los modelos transgénicos más utilizados para el estudio del scrapie es la línea tg338 ya que las características resultantes sus modificaciones genéticas hacen que sea más susceptible que los ratones *wild-type* al scrapie (Vilotte et al., 2001). Para comparar las características neuropatológicas y los cambios en la expresión de los *TLR* debidos a la infección con scrapie en el SNC en el hospedador natural, la especie ovina, y el modelo murino experimental tg338, se analizó el diencéfalo de ocho ratones tg338 infectados con scrapie en fase clínica y ocho ratones tg338 control.

Antes de infectar a los ratones tg338 vía intracerebral se confirmó la positividad y negatividad para la PrP^{Sc} por WB de los inóculos elaborados a partir de la médula oblongada de una oveja positiva y una oveja negativa a scrapie (Figura 31). Esta prueba además permitió comprobar que el patrón de glicosilación se correspondía con el de una cepa de scrapie clásico, localizándose la banda no glicosilada a unos 19 kDa.

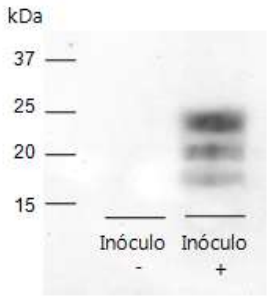


Figura 31. Western blot para la detección de la proteína prion patológica (PrP^{Sc}) de los inóculos administrados vía intracerebral en los ratones tg338 elaborados a partir de la médula oblongada de una oveja sana y una oveja con scrapie. Para la detección de la PrP^{Sc} se utilizó como anticuerpo primario SHA31. El peso molecular está representado a la izquierda en kilodaltons (kDa).

Para confirmar la infección de los ratones inoculados con scrapie, se analizó la acumulación de PrP^{Sc} por WB en el diencéfalo de cada ratón. Los resultados de los ratones inoculados con el homogeneizado positivo mostraron un patrón de bandas para la PrP^{Sc} similar al del inóculo administrado. Además, al tratarse de una infección experimental en la que la dosis, la edad de inoculación y el momento de sacrificio estuvieron controlados, la intensidad de la señal de la PrP^{Sc} fue bastante homogénea entre todos los ratones infectados (Figura 32). Por el contrario, en los ratones inoculados con el homogeneizado negativo a scrapie no se detectó PrP^{Sc}.

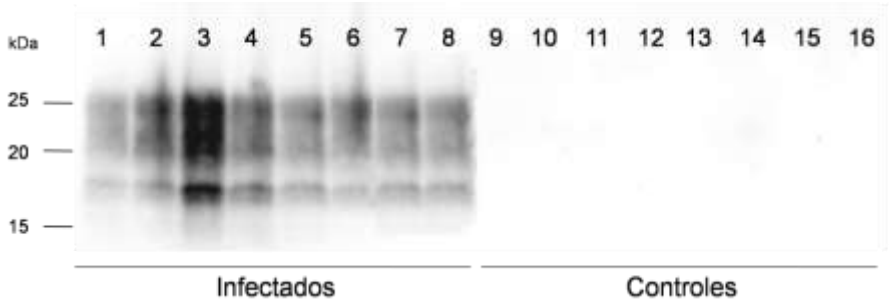


Figura 32. Western blot para la detección de la proteína prion patológica (PrP^{Sc}) utilizando como anticuerpo primario SHA31 en el diencéfalo de ocho ratones tg338 infectados vía intracerebral con scrapie y ocho ratones control. El peso molecular está representado a la izquierda en kilodaltons (kDa).

A continuación, se evaluaron las mismas características neuropatológicas que previamente se han mostrado en el SNC de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie: la espongiosis, los depósitos de PrP^{Sc}, la microgliosis y la astrogliosis en el diencéfalo de los ratones tg338 (Figura 33). De acuerdo con los resultados del WB, en los ratones control no se detectaron lesiones asociadas a infección por priones, ni señales de PrP^{Sc} y tampoco signos de una gliosis reactiva. En cambio, en los ratones infectados sí se observó un grado moderado de vacuolización localizada principalmente en el neuropilo. Asimismo, la inmunotinción de la PrP^{Sc} mostró un depósito intraneuronal y asociado al neuropilo generalizado. Por otro lado, el incremento significativo de la intensidad de inmunotinción de Iba1 y GFAP, que responde a la manifiesta hipertrofia de los cuerpos celulares y los procesos de la microglía y astroglía, evidenció una gliosis reactiva en el tálamo de los ratones infectados.

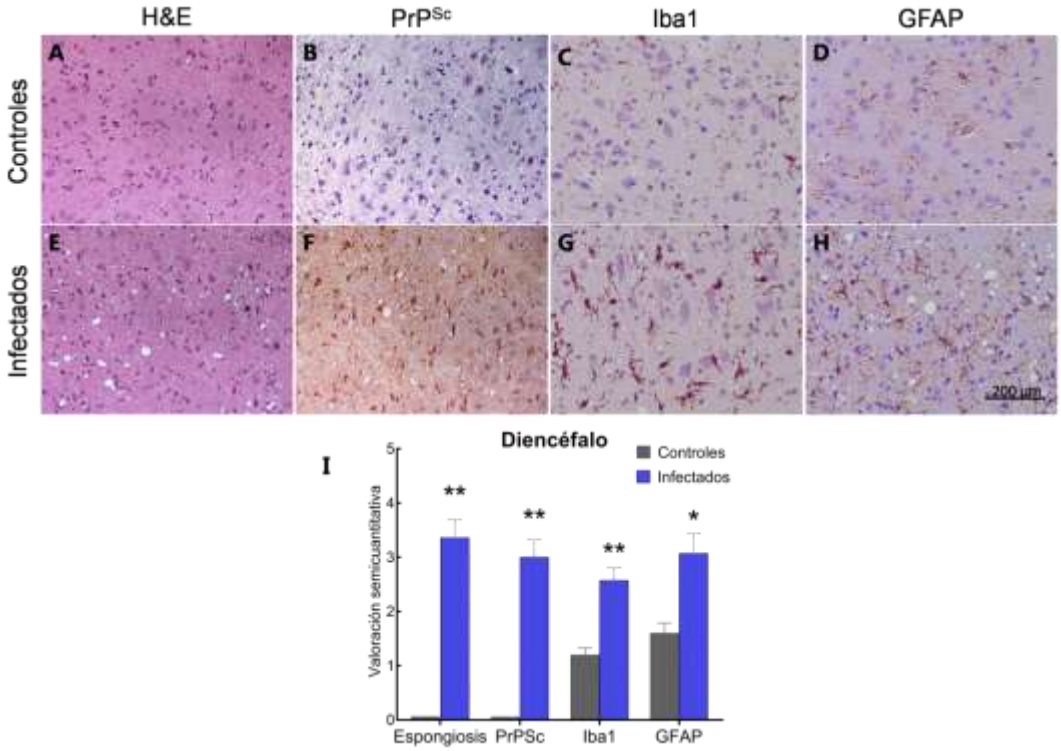


Figura 33. Imágenes representativas de las características neuropatológicas analizadas en el diencéfalo de los ratones tg338 inoculados vía intracerebral con scrapie y control. (**A, E**) Degeneración espongiforme evaluada mediante la tinción de hematoxilina-eosina (H&E). (**B, F**) Depósitos de PrP^{Sc} detectados con el anticuerpo R486 en los ratones infectados frente a la ausencia de inmunomarcaje en los ratones control. (**C, G**) Inmunohistoquímica para la detección de la molécula adaptadora de unión al calcio (Iba1). (**D, H**) Inmunomarcaje de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP). **(I)** El gráfico muestra los resultados estadísticos del análisis semicuantitativo de cada parámetro evaluado (de 0 a 5). *p<0.05, **p<0.01.

1.6. Cambios en la expresión génica de los *TLR 1-9* y de las citoquinas *TGFβ*, *IL10*, *TNFα* e *IL6* en el diencéfalo de ratones tg338.

Una vez confirmada la infección y el desarrollo de lesiones en el SNC del diencéfalo de los ratones tg338, se analizó mediante qPCR la expresión génica de los nueve *TLR* murinos (ya que esta especie no expresa el *TLR10*), *MyD88* y las mismas citoquinas analizadas anteriormente en las ovejas, dos antiinflamatorias, *TGFβ* e *IL10*, y dos proinflamatorias, *TNFα* e *IL6*. La media de los valores ΔCt de estos genes está representada gráficamente en el anexo 2.

Los resultados de la qPCR mostraron una sobreexpresión significativa ($p<0.05$) del *TLR1, TLR2, IL10 y TNFα* en el diencéfalo de los ratones infectados, mientras que la sobreexpresión del *TLR7* se quedó cerca del límite de significancia ($p<0.1$) (Figura 34). No se pudo analizar la expresión del *TLR8* ya que sus valores Ct fueron superiores al ciclo 35, valor establecido como máximo para la validación de los resultados de qPCR.

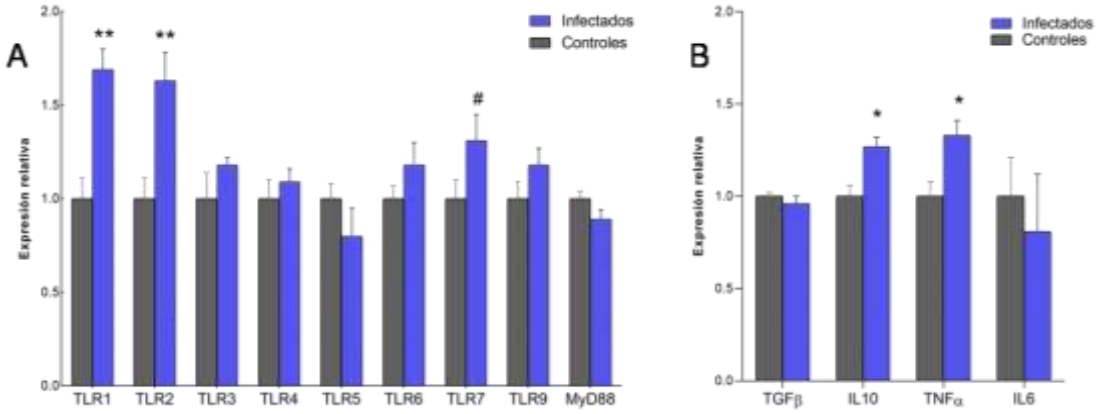


Figura 34. Expresión génica de los *TLR 1-7* y *9* **(A)** y las citoquinas antiinflamatorias (*TGFß* e *IL10*) y proinflamatorias (*TNFα* e *IL6*) **(B)** en el tálamo de los ratones tg338 infectados con scrapie y control (los controles están estandarizados al valor 1). #p<0.1, *p<0.05, **p<0.01.

Estudio 2: Análisis de los TLR en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y comparación con el modelo murino

2.1. Depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie.

Siguiendo el procedimiento del estudio anterior, antes del análisis genético se comprobó por WB e IHQ la presencia de la PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas diagnosticadas previamente como positivas a scrapie por sus signos clínicos y/o por la detección de PrP^{Sc} en las biopsias rectales tomadas en las granjas de origen. Los resultados del WB confirmaron la acumulación de PrP^{Sc} en el íleon de las doce ovejas infectadas con scrapie y mostraron que la intensidad de las bandas era ligeramente mayor en las ovejas en fase clínica avanzada respecto a las ovejas en fase clínica incipiente. Además, el patrón de bandas obtenido en todas las ovejas infectadas era el característico del scrapie clásico con una mayor intensidad y tamaño de las bandas diglicosilada y monoglicosilada y una banda no glicosilada de aproximadamente 19 kDa (Figura 35).

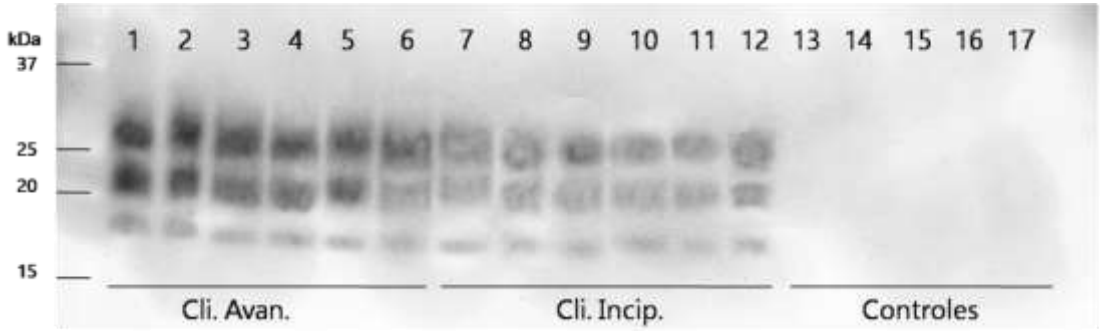


Figura 35. Western blot para la detección de PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control utilizando como anticuerpo primario SHA31 (SPI-Bio). Las muestras 1-6 corresponden con las ovejas en fase clínica avanzada, las muestras 7-12 con las ovejas en fase clínica incipiente y las muestras 13-17 con las ovejas control. El peso molecular está representado a la izquierda en kDa.

A continuación, por IHQ se analizaron los depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas infectadas. La mayoría de los depósitos de PrP^{Sc} detectados en el íleon estaban localizados en los folículos linfoides de las PP y principalmente concentrados en la zona clara del CG. Consecuentemente, se realizó un recuento del número total de folículos linfoides con y sin depósitos de PrP^{Sc} para conocer el porcentaje de folículos positivos y negativos en las ovejas en fase clínica avanzada e incipiente. Los resultados mostraron que no había diferencias entre el porcentaje de folículos linfoides positivos a scrapie entre las ovejas en fase clínica incipiente y avanzada, siendo positivos un 45.56% y un 48,68% de los folículos respectivamente (Tabla 13).

Tabla 13. Número de nódulos linfáticos totales y recuento de nódulos con depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control.

ID oveja	Fase clínica	Nº folículos	Nº folículos con PrP^{Sc}	% folículos positivos	Nº folículos medio por grupo	% nódulos positivos por grupo
1	Incipiente	22	16	72,73	15 ±2.60	45,56
2	Incipiente	20	7	35,00		
3	Incipiente	7	3	42,86		
4	Incipiente	8	2	25,00		
5	Incipiente	19	4	21,05		
6	Incipiente	14	9	64,29		
7	Avanzada	15	7	46,67	12.68 ±2.01	48,68
8	Avanzada	17	6	35,29		
9	Avanzada	9	4	44,44		
10	Avanzada	8	5	62,50		
11	Avanzada	8	4	50,00		
12	Avanzada	19	11	57,89		
20	Control	24	0	0	18.6 ±1.83	0,00
21	Control	14	0	0		
22	Control	15	0	0		
23	Control	20	0	0		
24	Control	20	0	0		

El patrón inmunohistoquímico de los depósitos de PrP^{Sc} en los folículos linfoides del íleon era mayoritariamente granular, compatible con el patrón intracitoplasmático descrito previamente en macrófagos (Heggebo et al., 2002; Jeffrey, McGovern, Martin, et al., 2000). No obstante, también se observó un patrón de tipo punteado fino asociado a estructuras intercelulares en la zona clara de los CG que podría corresponder con el de depósito de PrP^{Sc} asociado a los procesos de las CDF (Herrmann et al., 2003) (Figura 36). De acuerdo con los resultados del WB, el análisis semicuantitativo de los depósitos de PrP^{Sc} en los folículos linfoides de las PP mostró una cantidad ligeramente superior ($p<0.1$) en las ovejas en fase clínica avanzada respecto a las ovejas en fase clínica incipiente y cantidades significativamente superiores ($p<0.01$) en las ovejas infectadas, independientemente de la fase clínica, respecto a las ovejas control.

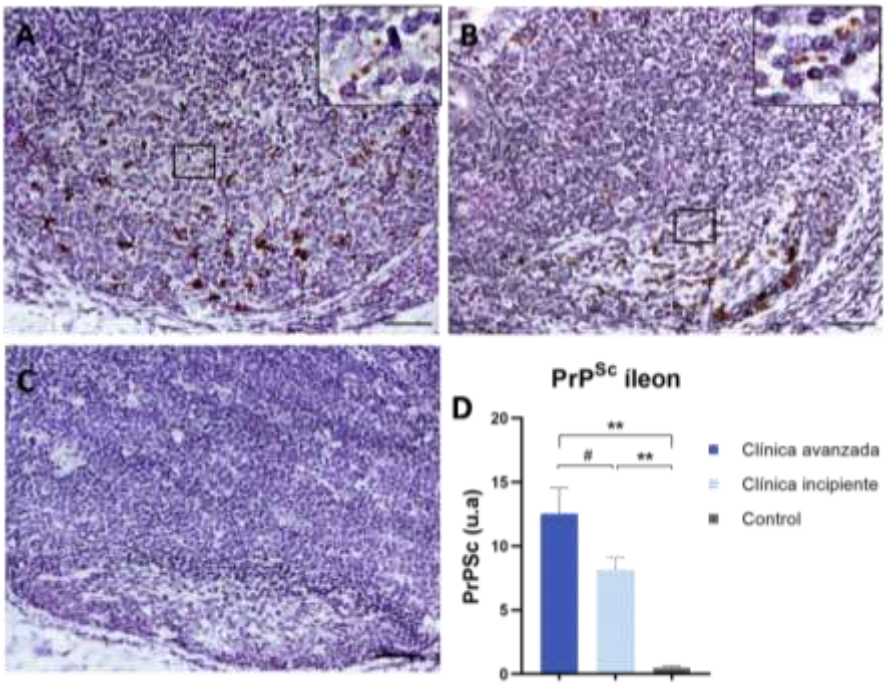


Figura 36. Imágenes representativas de la valoración inmunohistoquímica de la PrP^{Sc} utilizando el anticuerpo primario L42 en los folículos linfoides de las placas de peyer en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control. **(A)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica avanzada con un intenso patrón granular intracitoplasmático y un leve punteado fino distribuido por la zona clara del nódulo (imagen ampliada). **(B)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica incipiente con un patrón granular moderado y un leve punteado localizado también en la zona clara del folículo. **(C)** Folículo linfoide de una oveja control sin depósitos de PrP^{Sc}. **(D)** Representación gráfica del análisis semicuantitativo y las diferencias estadísticas calculadas con ANOVA de un factor con el software SPSS. $^{\#}p<0.1$, $*p<0.05$, $**p<0.01$. Barra de escala =50 µm.

Además de los depósitos de PrP^{Sc} en los folículos linfoides de las PP, también se detectaron depósitos en el plexo submucoso, localizado entre la mucosa y la capa muscular circular del intestino, y el plexo mientérico, localizado entre la capa circular y longitudinal de la capa muscular, del íleon de las ovejas en fase clínica avanzada e incipiente (Figura 37).

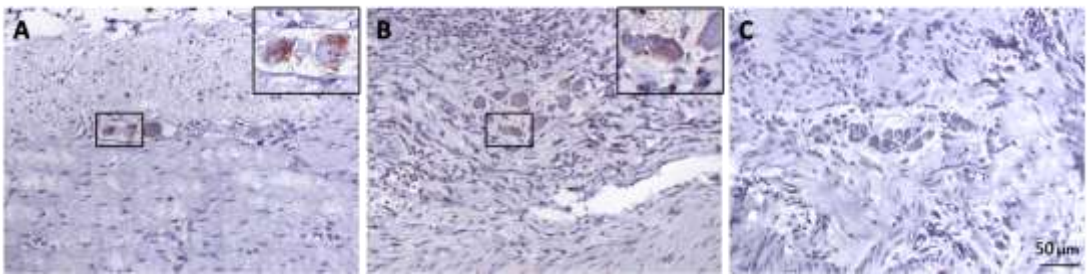


Figura 37. Depósitos de PrP^{Sc} en el sistema nervioso entérico del íleon de las ovejas infectadas con scrapie de forma natural respecto a una oveja control utilizando el anticuerpo primario L42. **(A)** Plexo mientérico de una oveja en fase clínica avanzada. **(B)** Plexo submucoso de una oveja en fase clínica incipiente. **(C)** Ausencia de depósitos en el plexo submucoso de una oveja control.

2.2. Cambios inmunohistoquímicos en los macrófagos y CDF en el íleon de las ovejas infectadas con scrapie.

Tras confirmar la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en el tejido linfoide del íleon de las ovejas y hallar patrones de depósito que podrían estar asociados con macrófagos y CDF, se decidió realizar un análisis semicuantitativo de la inmunotinción de dos marcadores celulares asociados con ambos tipos celulares. Para la detección de la totalidad de los macrófagos, independientemente de su fenotipo proinflamatorio o antiinflamatorio, se utilizó el anticuerpo primario anti-Iba1 (Wako). Para la detección de las CDF se eligió el marcador celular CNA.42 (Dako).

La IHQ frente a Iba1 permitió observar que, tanto en las ovejas infectadas como control, la mayor parte de los macrófagos estaban localizados en el centro germinal de los folículos linfoides de las PP y, en menor medida, en la zona oscura del folículo y la SED. El análisis semicuantitativo de los macrófagos en los folículos linfoides de las ovejas mostró que las infectadas en fase clínica avanzada tenían más macrófagos que el resto de grupos analizados, siendo esta diferencia estadísticamente significativa respecto a las ovejas control ($p<0.01$) mientras que respecto a las ovejas con clínica incipiente la diferencia era leve ($p<0.1$) (Figura 38).

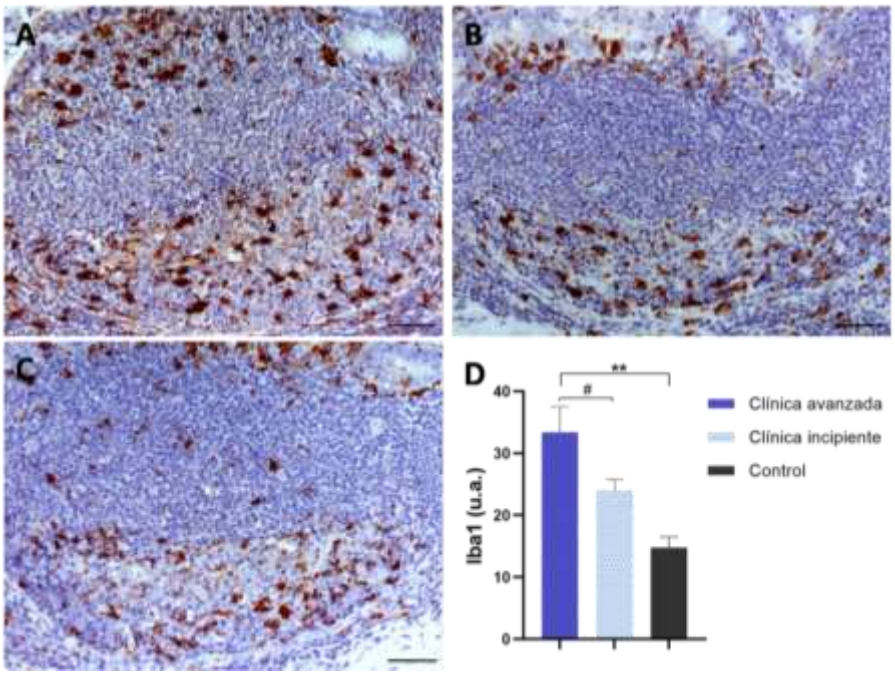


Figura 38. Imágenes representativas de la valoración inmunohistoquímica de macrófagos utilizando el anticuerpo primario para la detección de la molécula adaptadora de unión al calcio ionizado 1 (Iba1) en los folículos linfoides del íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control. **(A)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica avanzada. **(B)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica incipiente. **(C)** Folículo linfoide de una oveja control. **(D)** Representación gráfica del análisis semicuantitativo y las diferencias estadísticas calculadas con ANOVA de un factor con el software SPSS. $^{\#}p<0.1$, $^{**}p<0.01$. Barra de escala =50 µm.

Asimismo, el análisis semicuantitativo de la inmunotinción para las CDF también reflejó un aumento significativo del número de CDF en las ovejas en fase clínica avanzada ($p<0.01$) respecto a las ovejas control y leve respecto a las ovejas con clínica incipiente ($p<0.1$). En este caso, la inmunotinción estaba focalizada en el CG de los folículos linfoides y, en algunos casos, permitió observar la morfología estrellada de las CDF asociadas a las ramificaciones de estas células (Figura 39).

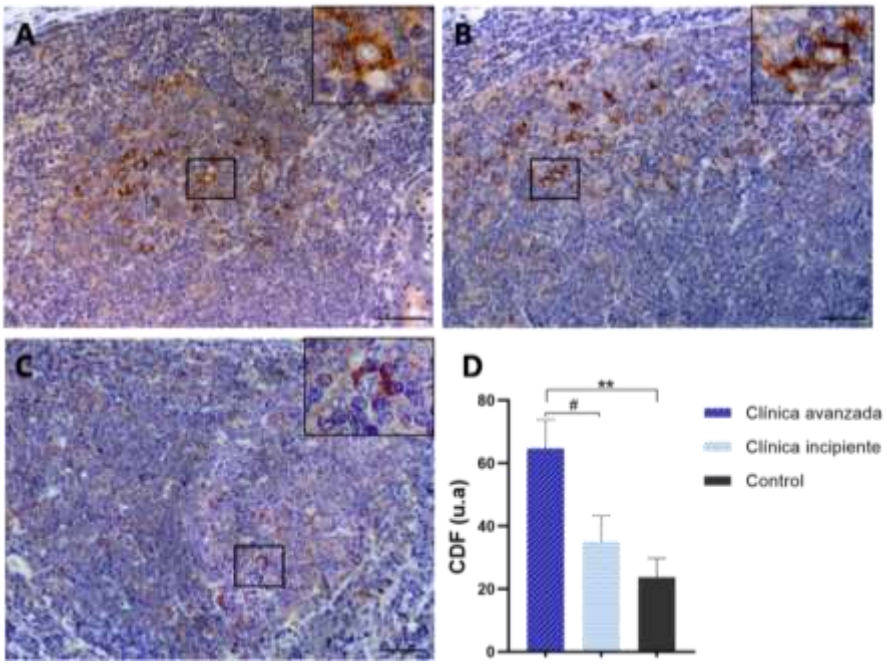


Figura 39. Imágenes representativas de la valoración inmunohistoquímica de las células dendríticas foliculares (CDF) utilizando el anticuerpo primario CNA.42 en los nódulos linfoides del íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control. **(A)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica avanzada. **(B)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica incipiente. **(C)** Folículo linfoide de una oveja control. **(D)** Representación gráfica del análisis semicuantitativo y las diferencias estadísticas calculadas con ANOVA de un factor con el software SPSS. $^{\#}p<0.1$, $^{**}p<0.01$. Barra de escala =50 µm.

2.3. Expresión génica de los *TLR* y otros genes asociados en íleon de las ovejas infectadas con scrapie natural.

Tras confirmar la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en el tejido linfoide y nervioso del íleon de las ovejas, se analizó por qPCR la expresión de los mismos genes estudiados anteriormente en el SNC de las ovejas: los diez *TLR* ovinos, *MyD88, Trif, CD36, CD14, Tollip, CD68, TNFα, IL6, IL10 y TGFβ*. Al estudio de estos genes se sumó *Mgfe8,* un gen que codifica para una proteína, lactadherina, que es secretada principalmente por las CDF. La lactadherina funciona como una opsonina que se une a la fosfatidilserina expresada en la superficie de células en apoptosis favoreciendo su eliminación por parte de los macrófagos (Kranich et al., 2010; Kranich et al., 2008). La media de los valores ΔCt calculados para estos genes está representada gráficamente en el anexo 3.

Los resultados de qPCR de los *TLR* mostraron el incremento de la expresión del *TLR4* ($p<0.05$) en las ovejas infectadas, tanto en fase clínica incipiente como avanzada, y la disminución de la expresión *TLR9* ($p<0.05$) en las ovejas en fase clínica avanzada respecto al

grupo control (Figura 40. A). En cuanto al resto de genes analizados, solo se detectó el incremento significativo de *Trif* ($p<0.01$) en las ovejas en fase clínica respecto a las control (Figura 40. B).

Considerando los resultados de la expresión génica en el SNC e íleon de las ovejas, destaca como patrón común el incremento del *TLR4* en las ovejas infectadas con scrapie respecto a las ovejas control.

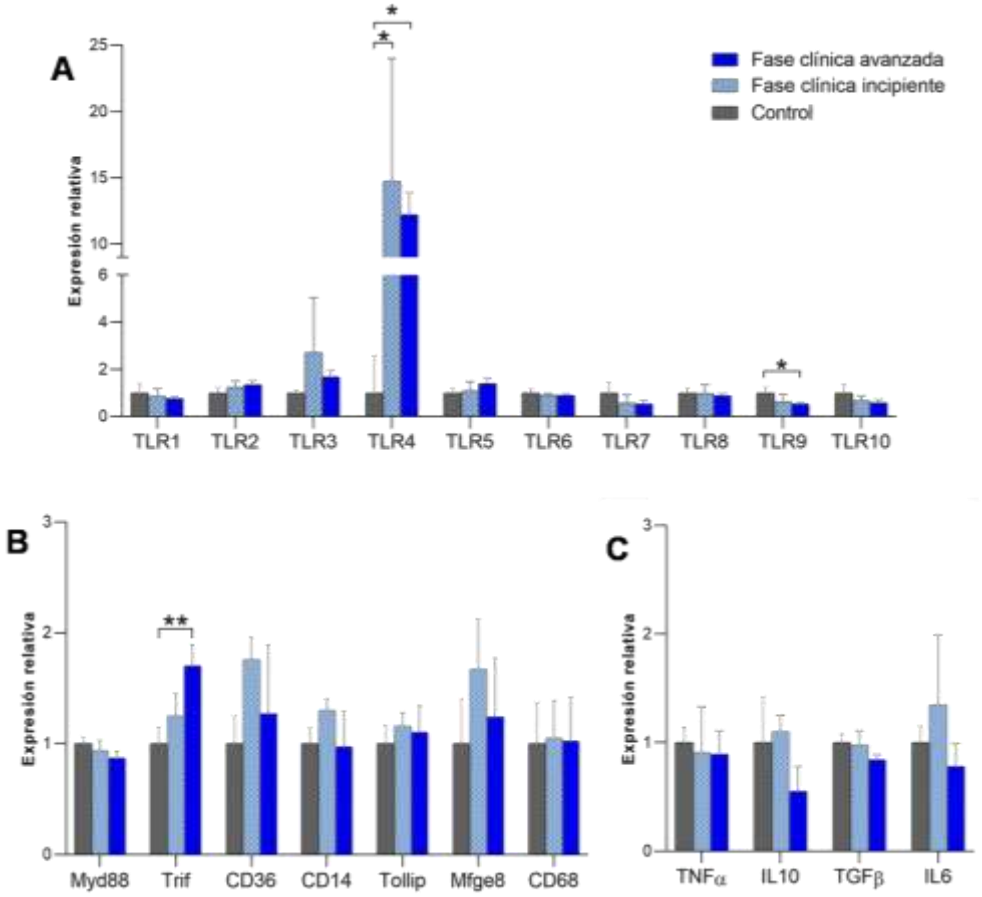


Figura 40. Expresión énicatural con scrapie en fase clínica avanzada e incipiente respecto a sus niveles de expresión en ovejas sanas (control) cuyos valores han sido estandarizados a 1. **(A)** Niveles de expresión de los 10 *TLR* ovinos. **(B)** Niveles de expresión de los genes que codifican para dos proteínas adaptadoras relacionadas con la cascada intracelular de los TLR, *MyD88* y *Triff*, dos receptores que colaboran con los TLR en la detección de moléculas, *CD14* y *CD36*, una molécula que regula negativamente la respuesta de los TLR, *Tollip*, una molécula que promueve la fagocitosis de células apoptóticas, *Mfge8*, y un receptor tipo scavenger expresado por macrófagos, *CD68*. **(C)** Niveles de expresión de las citoquinas *TNFα, IL10, TGFß, IL6 e IFNγ*. $^{\#}p<0.1$, $*p<0.05$.

2.4. Detección inmunohistoquímica del TLR4 en el íleon de las ovejas con scrapie.

Para tratar de determinar qué células podrían estar relacionadas con el incremento de la expresión del *TLR4*, por IHQ se analizó la inmunotinción del TLR4 en el íleon de las ovejas infectadas con scrapie y control (Figura 41). Aunque se probaron varios protocolos para reducir la tinción de fondo inespecífica generada por el anticuerpo primario, finalmente los resultados inmunohistoquímicos obtenidos imposibilitaron que las muestras pudieran ser evaluadas de forma semicuantitativa con el programa ImageJ. De cualquier modo, la

inmunotinción del TLR4 permitió al menos observar un patrón citoplasmático asociado a unas células cuyas características morfológicas eran compatibles con macrófagos en el interior de los folículos linfoides de las ovejas. A pesar de que este tipo de células tan intensamente teñidas fueron detectadas tanto en las ovejas del grupo control como en las ovejas infectadas, su proporción e intensidad era mucho mayor en las ovejas con scrapie.

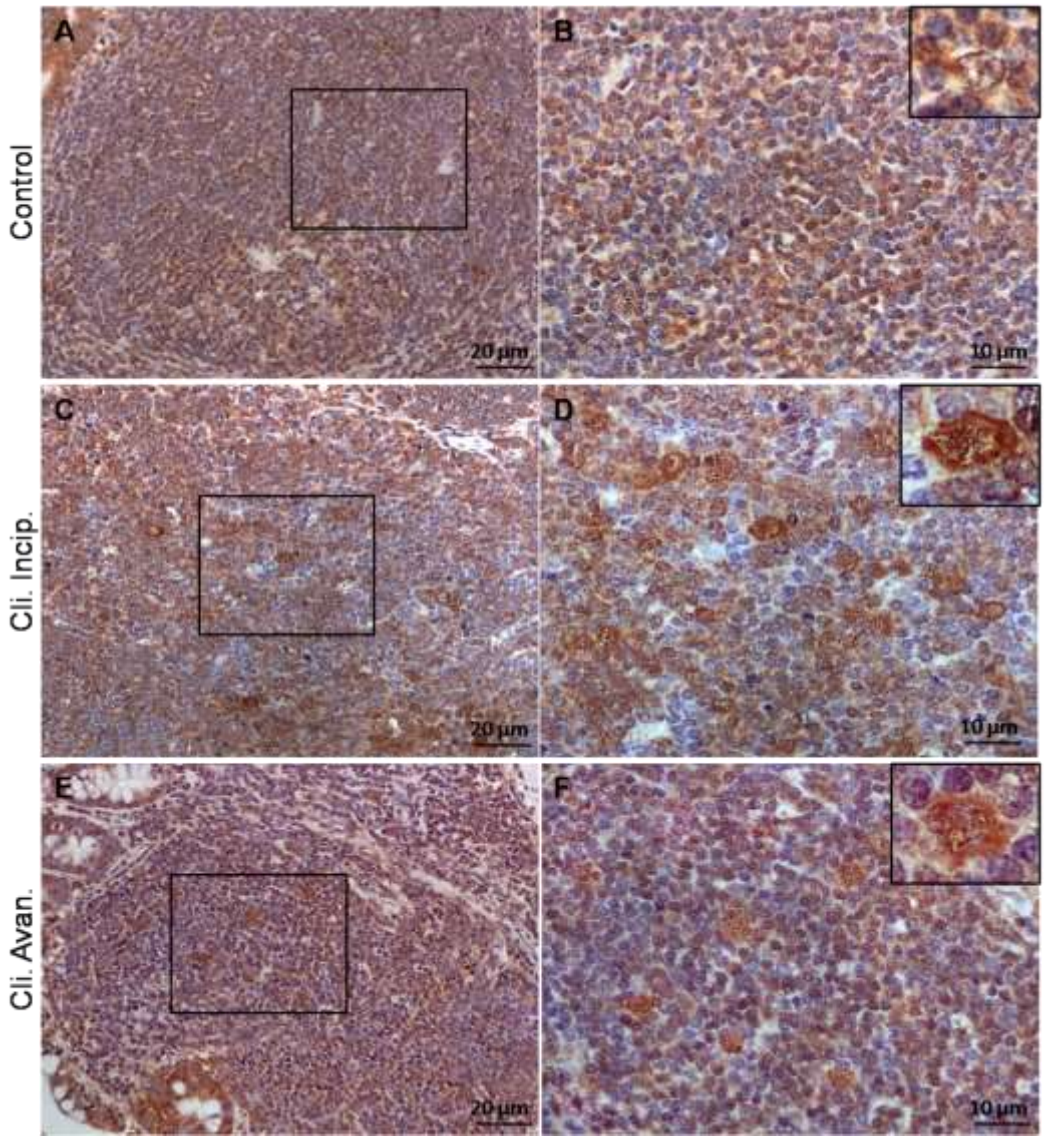


Figura 41. Marcaje inmunohistoquímico del TLR4 (NBP2-24538) en los folículos linfoides de las placas de peyer del íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control. **(A, B)** Folículo linfoide de una oveja del grupo control a 20X y 40X respectivamente. **(C, D)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica incipiente a 20X y 40X respectivamente. **(E, F)** Folículo linfoide de una oveja en fase clínica avanzada a 20X y 40X respectivamente.

Asimismo, la IHQ frente al TLR4 también mostró que las neuronas del sistema nervioso entérico, tanto las del plexo submucoso como mientérico, eran positivas a la inmunotinción del TLR4, aunque no se detectaron diferencias en la intensidad de la tinción entre las ovejas infectadas con scrapie y control (Figura 42).

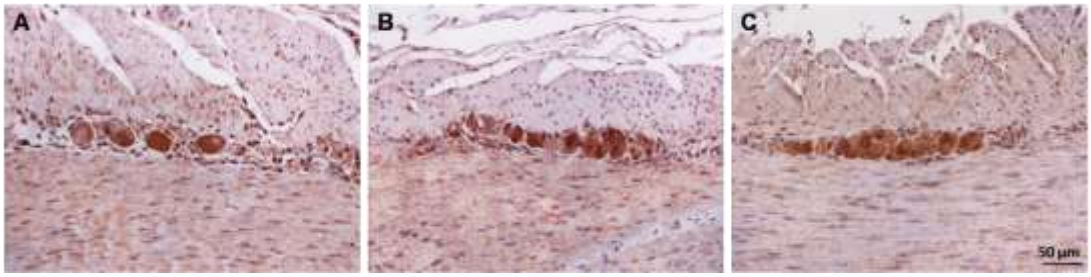


Figura 42. Marcaje inmunohistoquímico del TLR4 (NBP2-24538) en el sistema nervioso entérico de **(A)** una oveja infectada con scrapie en fase clínica avanzada, **(B)** en fase clínica incipiente y **(C)** control.

2.5. Cambios en la expresión génica en el íleon de ratones C57BL/6 inoculados vía oral con scrapie.

Antes de llevar a cabo las inoculaciones de los ratones C57BL/6, se confirmó por WB la presencia y ausencia del prion en el inóculo positivo y negativo a scrapie respectivamente (Figura 43).

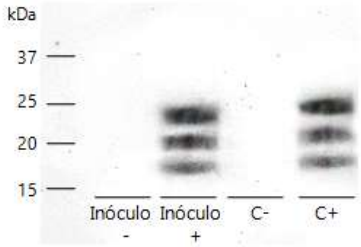


Figura 43. Western blot para la detección de PrP^{Sc} en 100µl de los inóculos administrados vía oral a los ratones C57BL/6 utilizando como anticuerpo primario SHA31. A la derecha de los inóculos se analizó un control negativo (C-) y un control positivo (C+) de scrapie. La imagen muestra el patrón de bandas característico del scrapie con sus 3 glicoformas. El peso molecular está representado a la izquierda en kDa.

Tal y como se ha explicado en el material y métodos, para intentar abarcar el periodo con mayor probabilidad de detección de cambios en la expresión génica de los *TLR* en el momento de acceso del prion a través de la barrera intestinal tras la inoculación vía intragástrica, los ratones se eutanasiaron en dos tiempos postinoculación, a las ocho y veinte horas postinoculación. El extremo más distal del íleon fue analizado por qPCR para determinar la expresión de los siguientes genes: *TLR1-9, MyD88, IL-10, TNFα y TGFß.* La media de los valores ΔCt calculados para estos genes está representada gráficamente en el anexo 4. Los resultados mostraron que a las ocho horas postinoculación la expresión del *TLR5, 7 y TNFα* estaba aumentada (p<0.05) en los ratones inoculados con el homogeneizado positivo a scrapie respecto a los ratones inoculados con SSF (Figura 44. A). Sin embargo, a las veinte horas postinoculación no se detectó ninguna expresión génica alterada en el íleon de los ratones (Figura 44. B). Por otro lado, la ausencia de cambios en la expresión de los genes analizados al comparar el grupo inoculado con SSF con respecto al grupo que recibió el inóculo negativo a scrapie descartó que el resto de componentes de homogeneizado de encéfalo, aparte del prion, fueran responsables de la sobreexpresión del *TLR5, TLR7* y *TNFα* en el grupo que recibió el inóculo positivo. Es decir, estos resultados demuestran que el

homogeneizado de encéfalo scrapie negativo no induce cambios significativos en el nivel de expresión de los genes analizados.

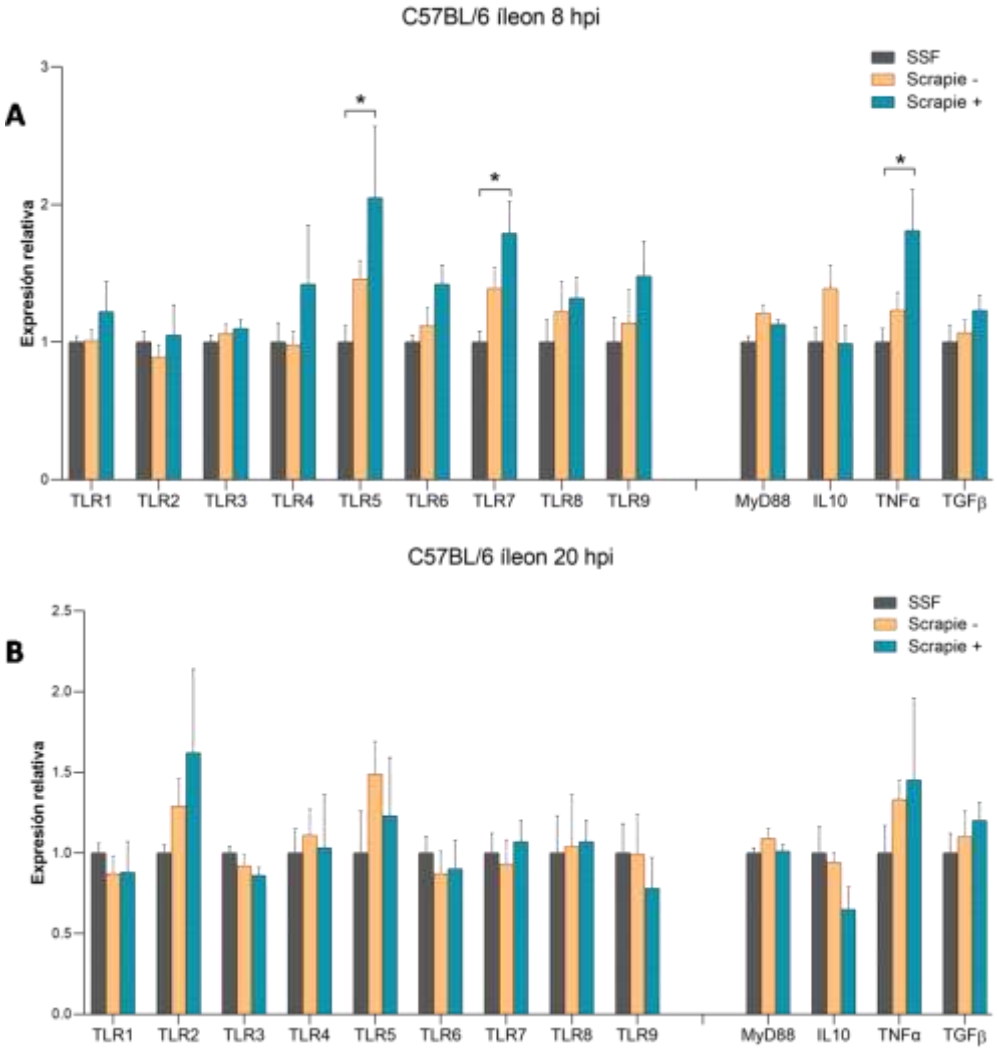


Figura 44. Expresión génica relativa de los genes *TLR1-9, MyD88, IL-10, TNFα* y *TGFβ*, en el íleon de los ratones C57BL/6 inoculados vía oral con un homgeneizado de encéfalo murino positivo a scrapie (scrapie+), un homogeneizado de encéfalo murino negativo a scrapie (scrapie -) y suero salino fisológico (SSF). **(A)** Resultados a las 8 horas postinoculación (hpi). **(B)** Resultados a las 20 hpi. $^{\#}p<0.1$, $^{*}p<0.05$.

2.6. Diferencias histológicas e inmunohistoquímicas en el íleon de los corderos neonatos y ovejas adultas inoculados vía oral con scrapie.

Siguiendo el mismo procedimiento de los estudios anteriores, por WB se comprobó la presencia y la ausencia del prion en los inóculos administrados vía oral en los corderos y las ovejas adultas (Figura 45).

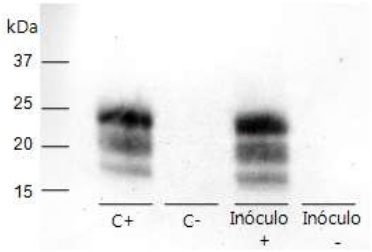


Figura 45. Western blot para la detección de PrP^{Sc} en 100µl de los inóculos administrados vía oral en los corderos y ovejas adultas utilizando como anticuerpo primario SHA31. A la izquierda de los inóculos se analizó un control positivo (C+) y un control positivo (C-) de scrapie. La imagen muestra el patrón de bandas característico del scrapie con sus 3 glicoformas. El peso molecular está representado a la izquierda en kDa.

Al examinar las diferentes secciones del íleon de los corderos y las ovejas inoculados vía oral en tinciones de hematoxilina-eosina no se observó ninguna lesión histopatológica evidente (Figura 46). No obstante, en el caso de los corderos se detectó un alto número de figuras mitóticas en el interior de los folículos linfoides de las PP compatibles con la alta actividad linfopoyética que tiene lugar en las PP en corderos tan jóvenes (Figura 46) (Reynaud et al., 1991; Reynolds & Morris, 1983). Cabe destacar que todos los folículos linfoides de los corderos, a diferencia de las ovejas adultas, eran de tipo primario, es decir, ninguno tenía desarrollado el CG característico de los folículos secundarios.

Asimismo, teniendo en cuenta que la cantidad de tejido linfoide es un factor asociado a la susceptibilidad al scrapie (St Rose et al., 2006), se calculó el número medio de folículos linfoides en el íleon de los corderos y las ovejas adultas cuantificando el número total de folículos de cada animal en una sección del íleon (Tabla 21). El número medio de folículos linfoides en los corderos fue significativamente superior al de las ovejas pero, de acuerdo con el estudio de St Rose y colaboradores (St Rose et al., 2006), no se encontraron diferencias estadísticas en el número medio de folículos en los corderos o las ovejas al comparar los animales con genotipo susceptible y resistente al scrapie clásico.

Tabla 14. Número de folículos linfoides medios y SEM en el íleon de los corderos y las oevejas adultas inoculadas vía oral.

	Nº medio de folículos linfoides	
Grupo	**Corderos**	**Ovejas**
IS	45, 33 (± 3,79)	13,33 (±3,68)
CS	43,25 (±3,25)	11,16 (±5,58)
IR	51.67 (±5.04)	13,71 (±3,49)
CR	53,54 (±5.04)	10,43 (±1,67)
Nº medio total	46,68 (±2,32)	12,86 (±3,60)

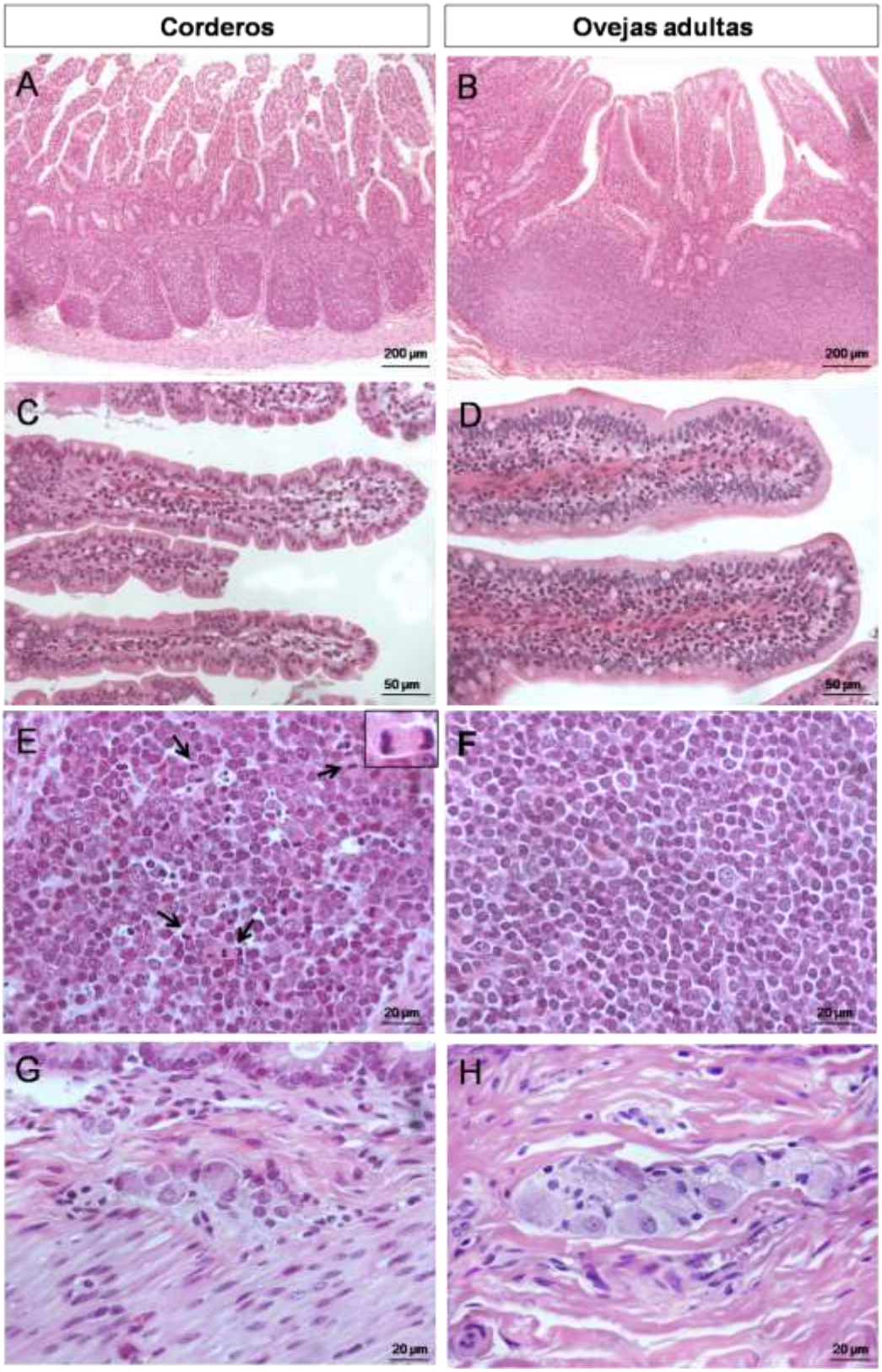


Figura 46. Imágenes comparativas del íleon de los corderos (izquierda) y ovejas (derecha) inoculadas vía oral con scrapie mediante tinción de hematoxilina-eosina. **(A, B)** Mayor número de folículos linfoides en los corderos que en las ovejas adultas. **(C, D)** Vellosidades intestinales más estrechas en los corderos que en las ovejas adultas. **(E, F)** Folículo linfoide de un cordero con un gran número de figuras mitóticas (flechas) respecto al de una oveja adulta en donde no es habitual observar dichas figuras. **(G, H)** Sistema nervioso entérico (plexo submucoso) de un cordero y una oveja adulta.

A continuación se analizó por IHQ posibles depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de los corderos y las ovejas para tratar de confirmar su captación a nivel intestinal tras las inoculaciones vía oral con scrapie, pero los resultados no mostraron ninguna señal asociada a la PrP^{Sc} (Figura 47).

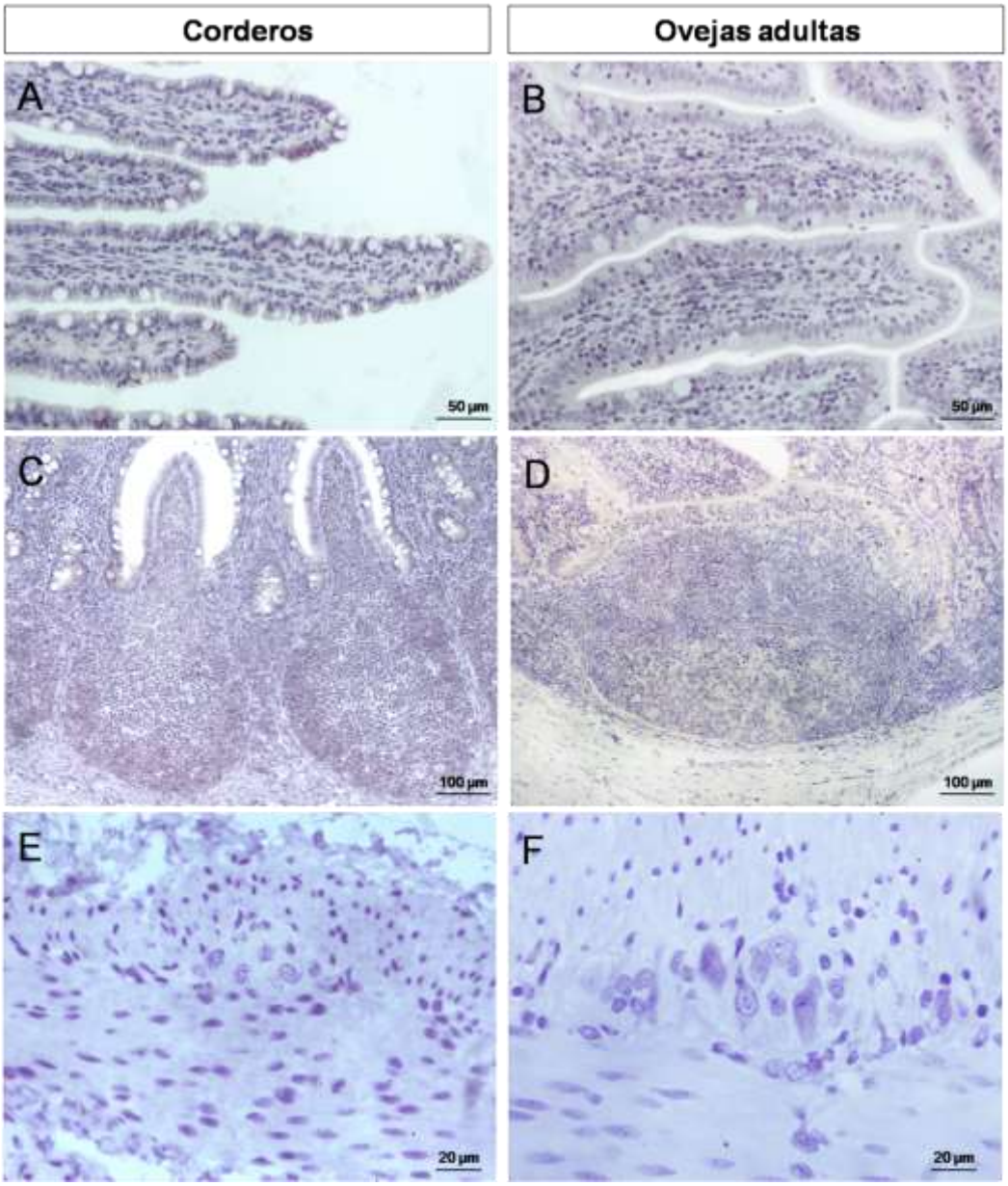


Figura 47. Inmunohistoquímica para la detección de la PrP^{Sc} utilizando el anticuerpo primario L42 en el íleon de dos corderos (izquierda) y ovejas adultas (derecha) inoculadas con el homogeneizado positivo a scrapie. Las imágenes muestran la ausencia de inmunotinción en el epitelio **(A B)**, en las placas de peyer **(C, D)** y en el sistema nervioso periférico **(E, F).**

Continuando con el examen IHQ, en el íleon de los corderos y las ovejas adultas se llevó a cabo la inmunotinción de macrófagos y CDF ya que la densidad de ambos tipos celulares también es considerada un factor asociado a la susceptibilidad al scrapie (Mabbott et al., 2003; Maignien et al., 2005). Para el análisis de los macrófagos y las CDF se utilizaron como anticuerpos primarios anti-Iba1 y CNA.42 respectivamente.

El estudio IHQ de Iba1 en las PP mostró que en los corderos los macrófagos estaban distribuidos de forma uniforme por toda la superficie del folículo linfoide, mientras que en las ovejas adultas estaban distribuidos principalmente por el CG y la SED de los folículos linfoides. Por el contrario, la valoración semicuantitativa de la intensidad de Iba1 en las PP no reveló diferencias entre los corderos y las ovejas, ni entre los diferentes grupos de corderos y ovejas (Figura 48).

En el caso de las CDF, el análisis IHQ evidenció importantes diferencias tanto en la distribución como en la cantidad de CDF entre los corderos y las ovejas adultas. Así, en el caso de los corderos las CDF se observaron distribuidas por todo el folículo primario mientras que en las ovejas adultas estaban focalizadas en el CG de los folículos linfoides. Aunque el análisis semicuantitativo no mostró diferencias en la intensidad de la inmunotinción de las CDF entre los cuatro grupos de corderos y ovejas, sí que reveló una cantidad significativamente mayor ($p<0,001$) de CDF en los corderos respecto a las ovejas adultas (Figura 49).

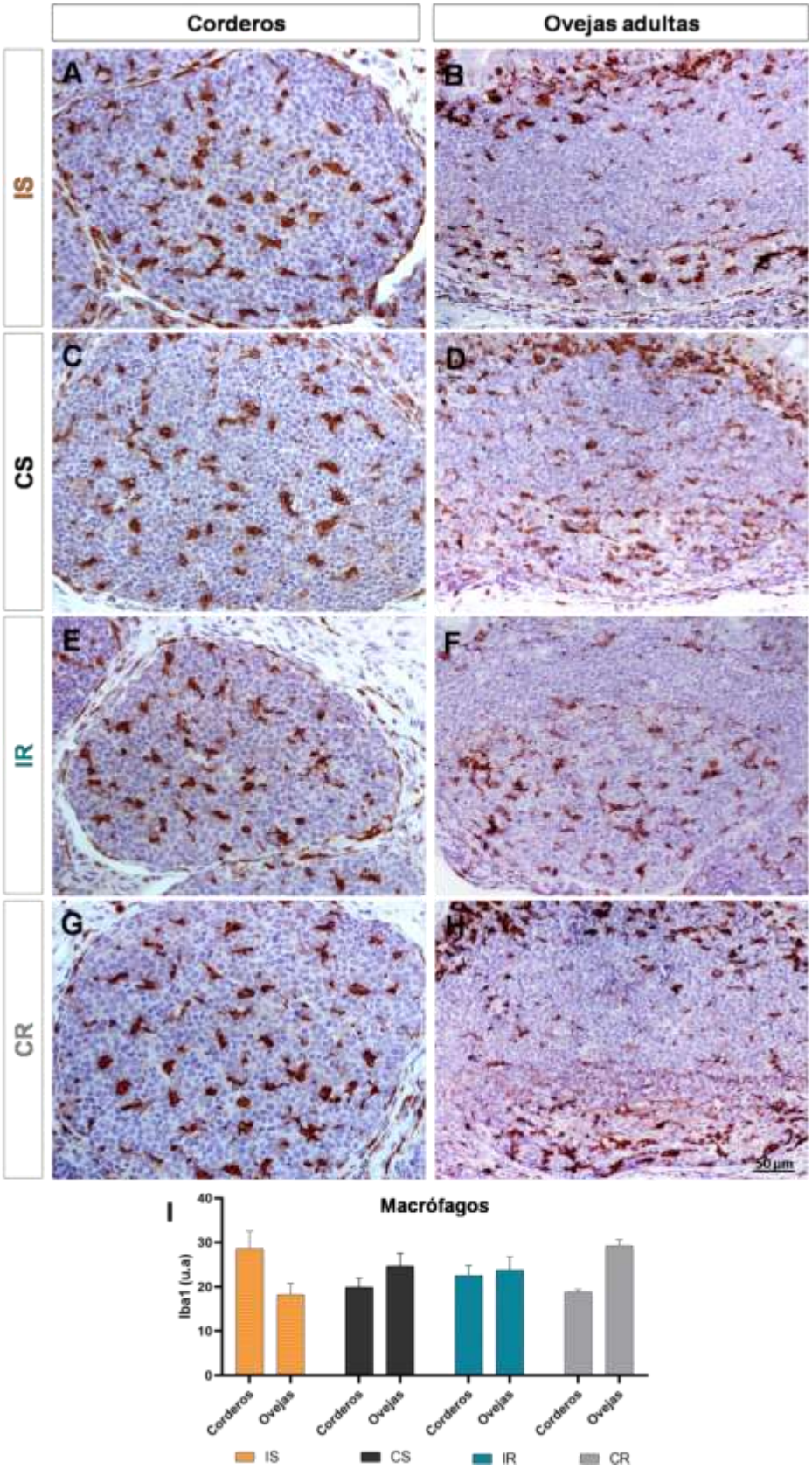


Figura 48. Inmunohistoquímica para la detección de macrófagos utilizando el anticuerpo primario anti-Iba1 en los folículos linfoides del íleon de los corderos y las ovejas inoculadas vía oral: infectados susceptibles (IS) **(A, B),** controles susceptibles (CS) **(C, D)** infectados resistentes (IR) **(E, F)** y controles resistentes (CR) **(G, H)**. **(I)** Representación gráfica del análisis semicuantitativo realizado con el software ImageJFiji.

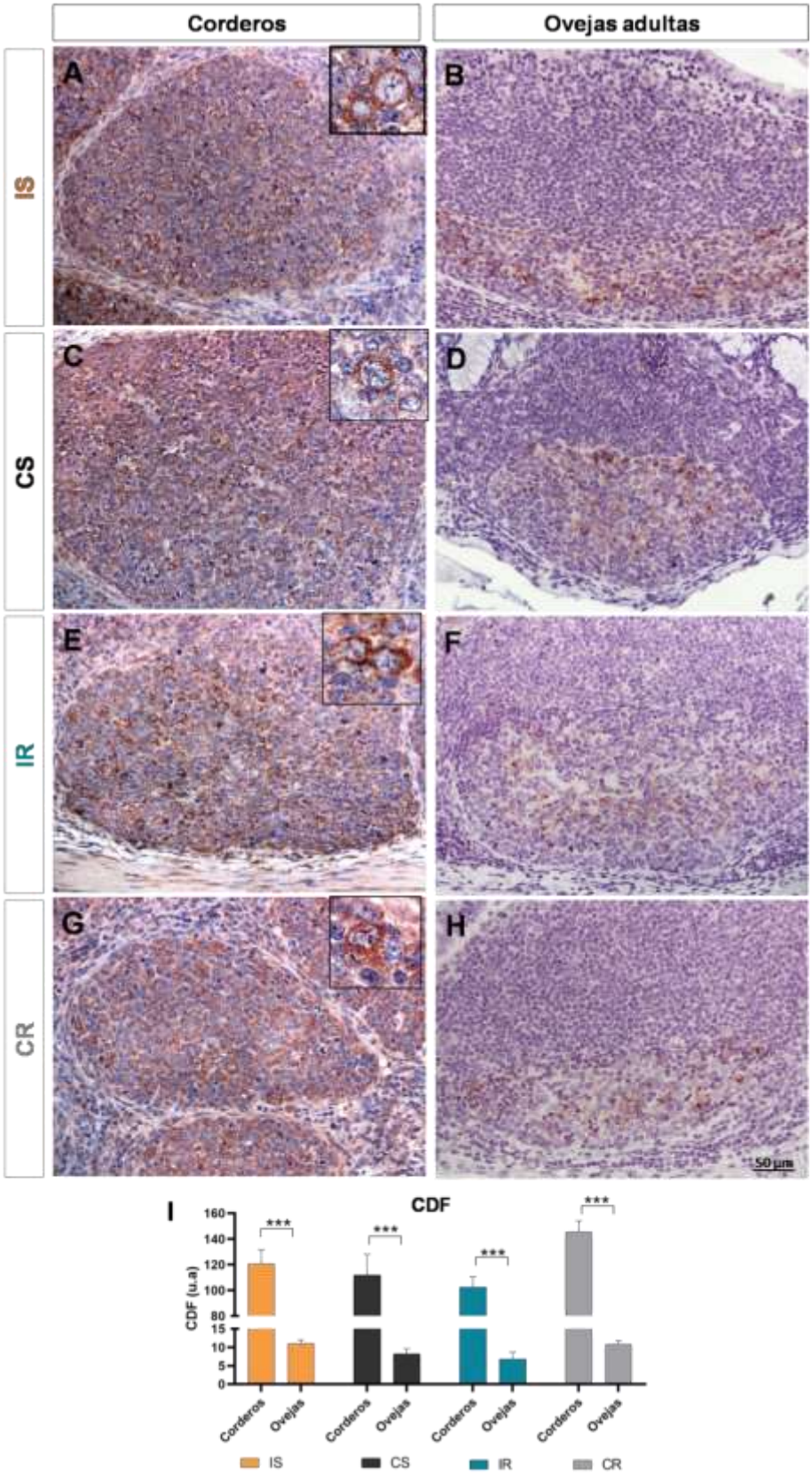


Figura 49. Inmunohistoquímica para la detección de células dendríticas foliculares (CDF) utilizando el anticuerpo primario CNA.42 en los folículos linfoides del íleon de los corderos inoculados vía oral: infectados susceptibles (IS) **(A, B),** controles susceptibles (CS) **(C, D)** infectados resistentes (IR) **(E, F)** y controles resistentes (CR) **(G, H)**. **(I)** Representación gráfica del análisis semicuantitativo realizado con el software ImageJFiji. ***p<0.001

2.7. Cambios es la expresión génica y proteica en el íleon de los corderos y las ovejas adultas tras la inoculación vía oral.

A continuación, se analizó la expresión génica de los diez *TLR* ovinos, *MyD88* y tres citoquinas, *TGFß, TNFα* e *IL10,* en el íleon de los corderos y las ovejas adultas inoculadas vía oral. La media de los valores ΔCt calculados para estos genes está representada gráficamente en el anexo 5 y 6. Los resultados de la expresión del *TLR3* en los corderos no están representados en los gráficos porque sus valores Ct fueron superiores al ciclo 35 de qPCR, valor establecido como máximo para la validación de los resultados de qPCR.

Para detectar posibles alteraciones en la expresión génica en el íleon de los corderos y las ovejas adultas, se realizaron varios análisis estadísticos agrupando a los animales según el inóculo recibido y su genotipo. Inicialmente, para comprobar si la inoculación con scrapie podía inducir cambios en la expresión génica de los corderos y las ovejas, se compararon los resultados de los corderos y ovejas infectadas (I) respecto a sus controles (C) independientemente de su genotipo resistente (R) o susceptible (S) (Figura 50 y 51. A). Este primer análisis mostró que la expresión del *TLR7* y *TNFα* se había incrementado ($p<0.05$) en los corderos infectados respecto a los control, mientras que en las ovejas no se detectaron cambios en la expresión génica. A continuación, para estudiar el efecto del genotipo frente al prion, se comparó la expresión relativa de los corderos y las ovejas con genotipos susceptibles o resistentes (Figura 50 y 51. B, C). En este caso, tampoco se encontraron diferencias significativas al comparar entre las ovejas IS *vs* CS y las IR *vs* CR ni en los corderos IR vs CR, sin embargo, en los corderos IS sí que se detectó un incremento significativo del *TLR7* y *TNFα* respecto a los CS. Por último, a modo de control, se compararon los resultados en las ovejas y los corderos inoculados o control pero con distinto genotipo para averiguar si había diferencias en la expresión génica con independencia del inóculo recibido (Figura 50 y 51. D, E). Este análisis mostró que entre los corderos con distinto genotipo no había diferencias en la expresión génica pero en las ovejas IR y CR sí que se observó una mayor expresión de los *TLR6, 8 y 10* respecto a las ovejas IS y CS respectivamente.

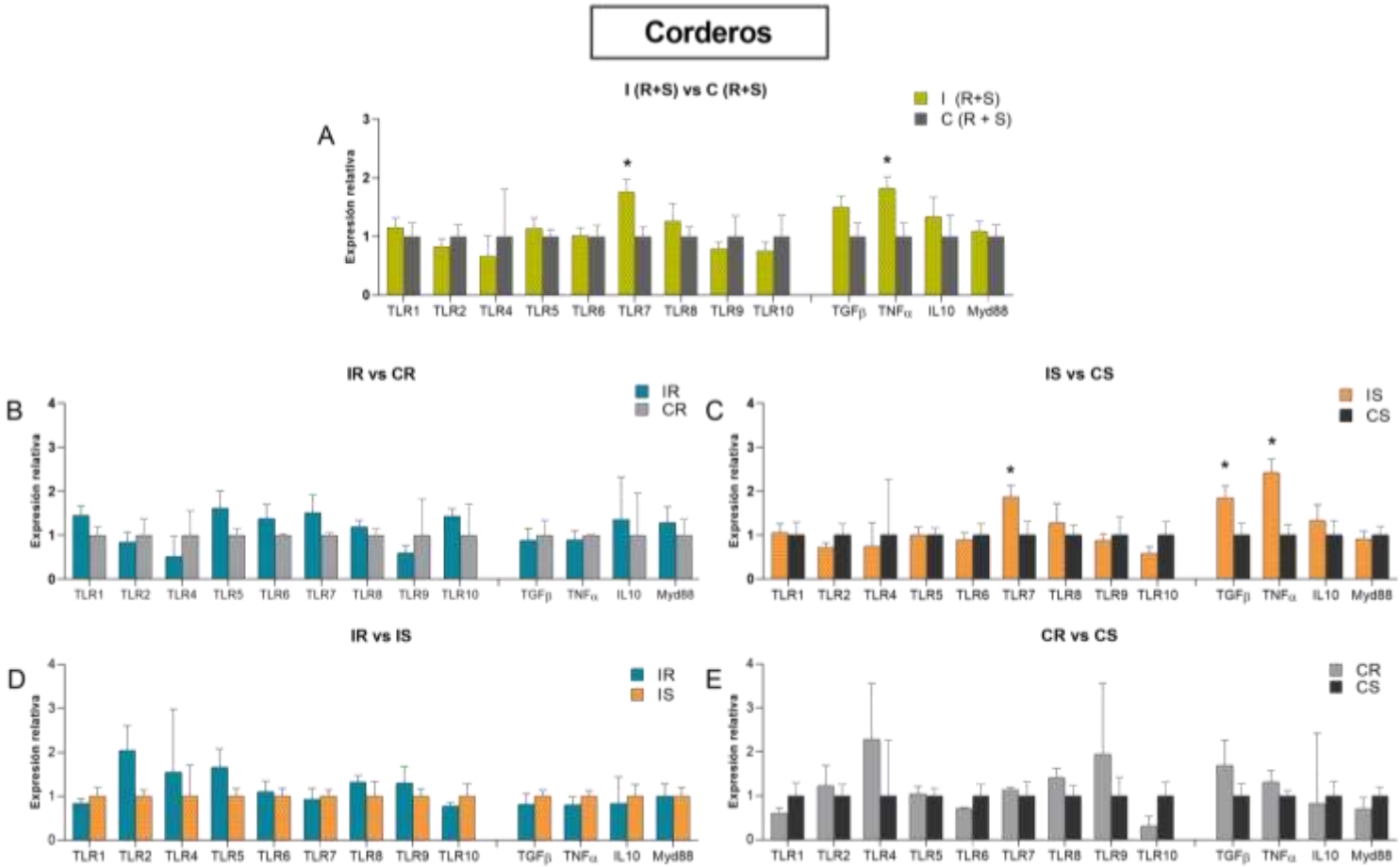


Figura 50. Representación gráfica de la expresión relativa de los genes *TLR1*, *TLR2*, *TLR4-9*, *TGFß*, *TNFα*, *IL-10* y *MyD88* en el íleon de los corderos inoculados vía oral a las 48 horas de vida y eutanasiados a las 48 horas postinoculación. **(A)** Expresión génica de los corderos infectados (I) relativa a los corderos control (C) independientemente de su genotipo susceptibles (S) o resistentes (R). **(B)** Expresión génica de los corderos IR relativa a los CR. **(C)** Expresión génica de los corderos IS relativa a los CS. **(D)** Expresión génica de los corderos IS relativa a los CS. **(E)** Expresión génica de los corderos CR relativa a los CS. *p<0.5.

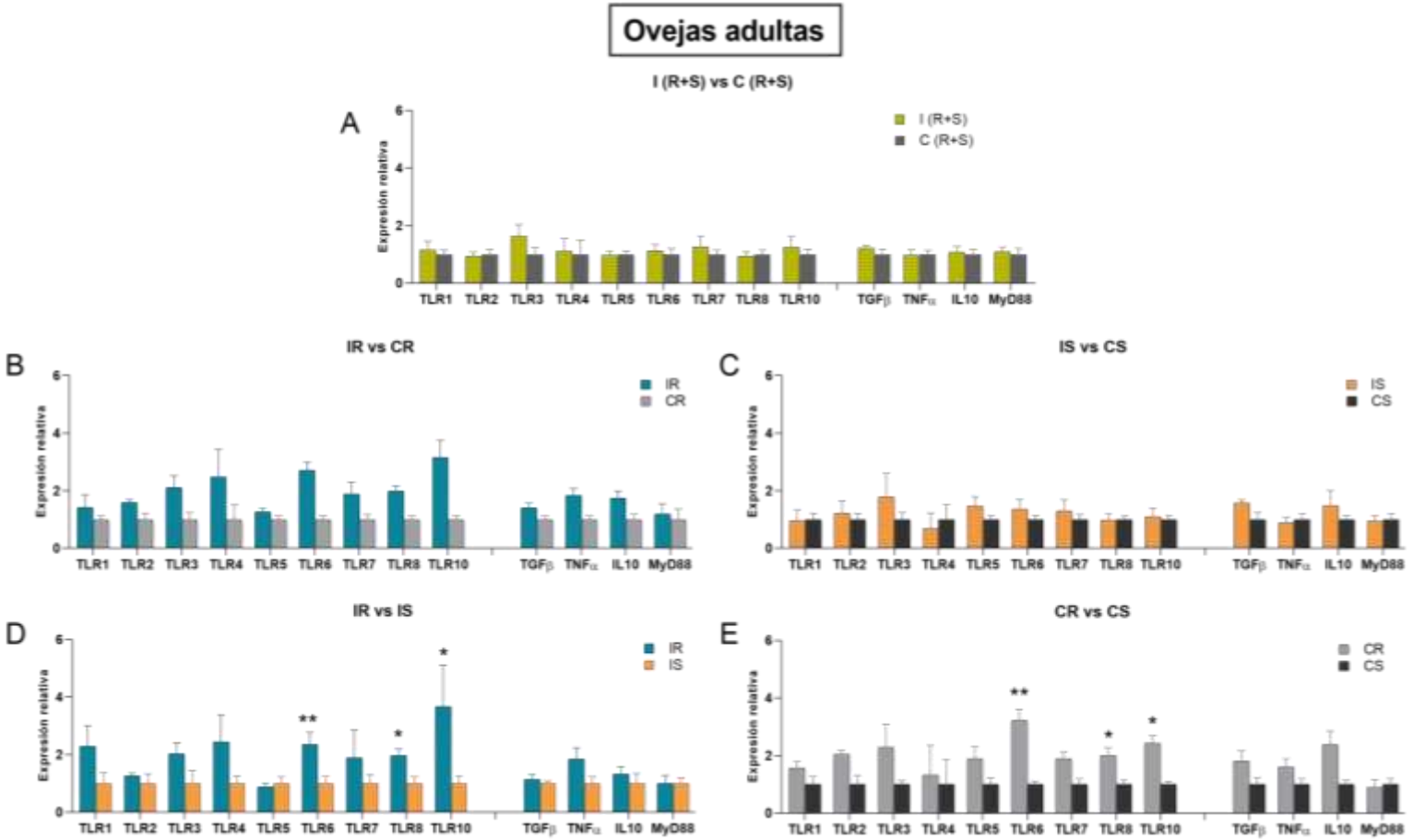


Figura 51. Representación gráfica de la expresión relativa de los genes *TLR1-8*, *TLR10*, *TGFß*, *TNFα*, *IL10* y *MyD88* en el íleon de las ovejas inoculadas vía oral y eutanasiadas a las 65 horas postinoculación. **(A)** Expresión génica de las ovejas infectadas (I) relativa a las ovejas control (C) independientemente de su genotipo susceptibles (S) o resistentes (R). **(B)** Expresión génica de las ovejas IR relativa a las CR. **(C)** Expresión génica de las ovejas IS relativa a las CS. **(D)** Expresión génica de las ovejas IS relativa a las CS. **(E)** Expresión génica de las ovejas CR relativa a las CS. *p<0.5, **p< 0.01.

Para comprobar si el incremento de expresión génica del *TLR7* se correlacionaba con un aumento a nivel proteico, se analizó por WB el TLR7 en el íleon de los corderos. Los resultados mostraron dos bandas situadas aproximadamente a 140 kDa y 60 kDa que corresponden, respectivamente, con la forma precursora del TLR7 y con el fragmento C-terminal liberado tras la proteólisis del precursor del TLR7 (Dombkowski et al., 2019; Hipp et al., 2013) (Figura 52). A pesar de la baja intensidad de las bandas del TLR7, sinónimo de su baja expresión proteica, la valoración semicuantitativa de la intensidad y tamaño de las bandas mostró una cantidad significativamente mayor de la forma escindida (60 kDa) en los corderos infectados respecto a los controles (Figura 52. A) y en los corderos IS respecto a los CS y CR (Figura 52. B). Por tanto, los resultados del WB son coherentes con los de qPCR ya que ambas técnicas apuntan hacia un aumento de la expresión del TLR7 en los corderos infectados con scrapie siendo dicho incremento especialmente notable en los corderos con genotipo susceptible.

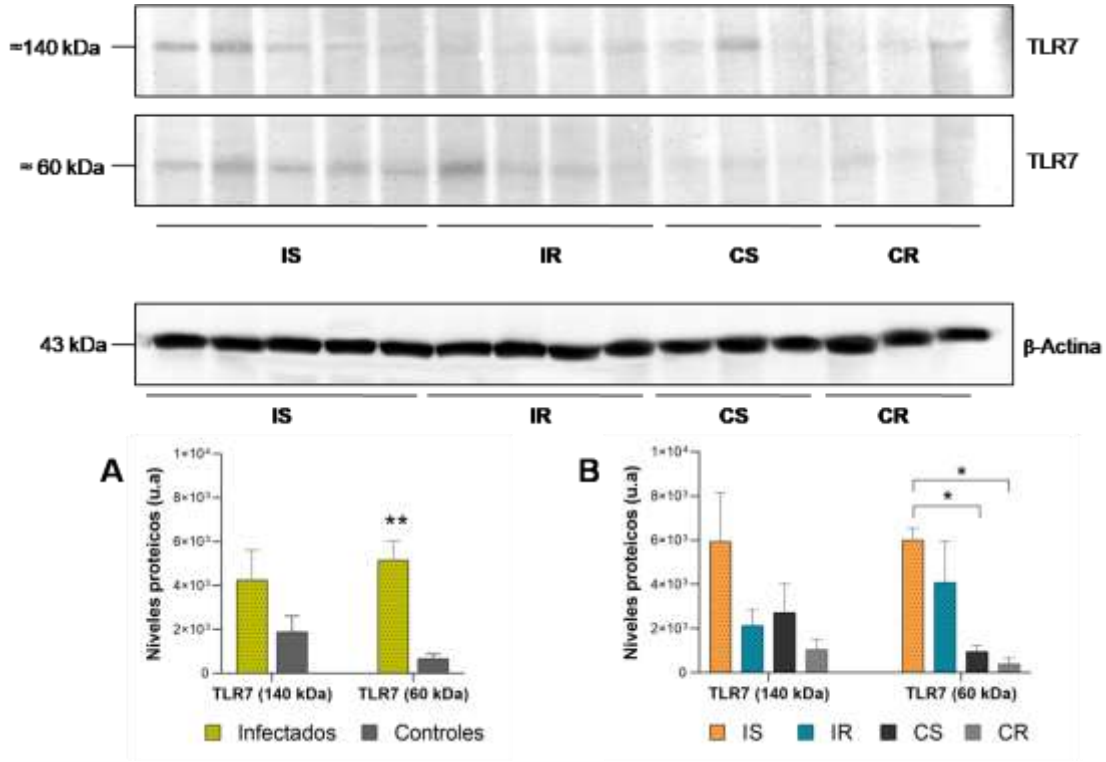


Figura 52. Niveles proteicos del TLR7 relativos a la β-actina en el íleon de los corderos inoculados vía oral con un homogeneizado de encéfalos ovinos positivo a scrapie (infectados, n=9) o negativo (control=6) y clasificados según su genotipo en: infectados susceptibles (IS), infectados resistentes (IR), control susceptible (CS) y control resistente (CR). El doble patrón de bandas generado por el anticuerpo primariol anti-TLR7 (ab124928) se corresponde con la forma precursora del TLR7 (140 kDa) y su forma activa correspondiente a su extremo C-terminal generada tras un proceso proteólisis enzimática (60 kDa). Los gráficos muestran los resultados de la densitometría de las bandas agrupando a los corderos en infectados y control **(A)** o clasificándolos en cuatro grupos según el inóculo recibido y su genotipo **(B)**. ** $p<0.01$, * $p< 0.01$.

Finalmente, para tratar de asociar el incremento en la expresión génica y proteica del TLR7 con las células responsables de dicho incremento, se analizó mediante técnicas IHQ el TLR7 en el íleon de los corderos (Figura 53). El inmunomarcaje mostró una tinción intracitoplasmática en células localizadas en las IFR, en el interior de los folículos y en el

plexo mientérico. Sin embargo, el análisis semicuantativo del inmunomarcaje del TLR7 en estas tres áreas no evidenció diferencias significativas entre los cuatro grupos de corderos.

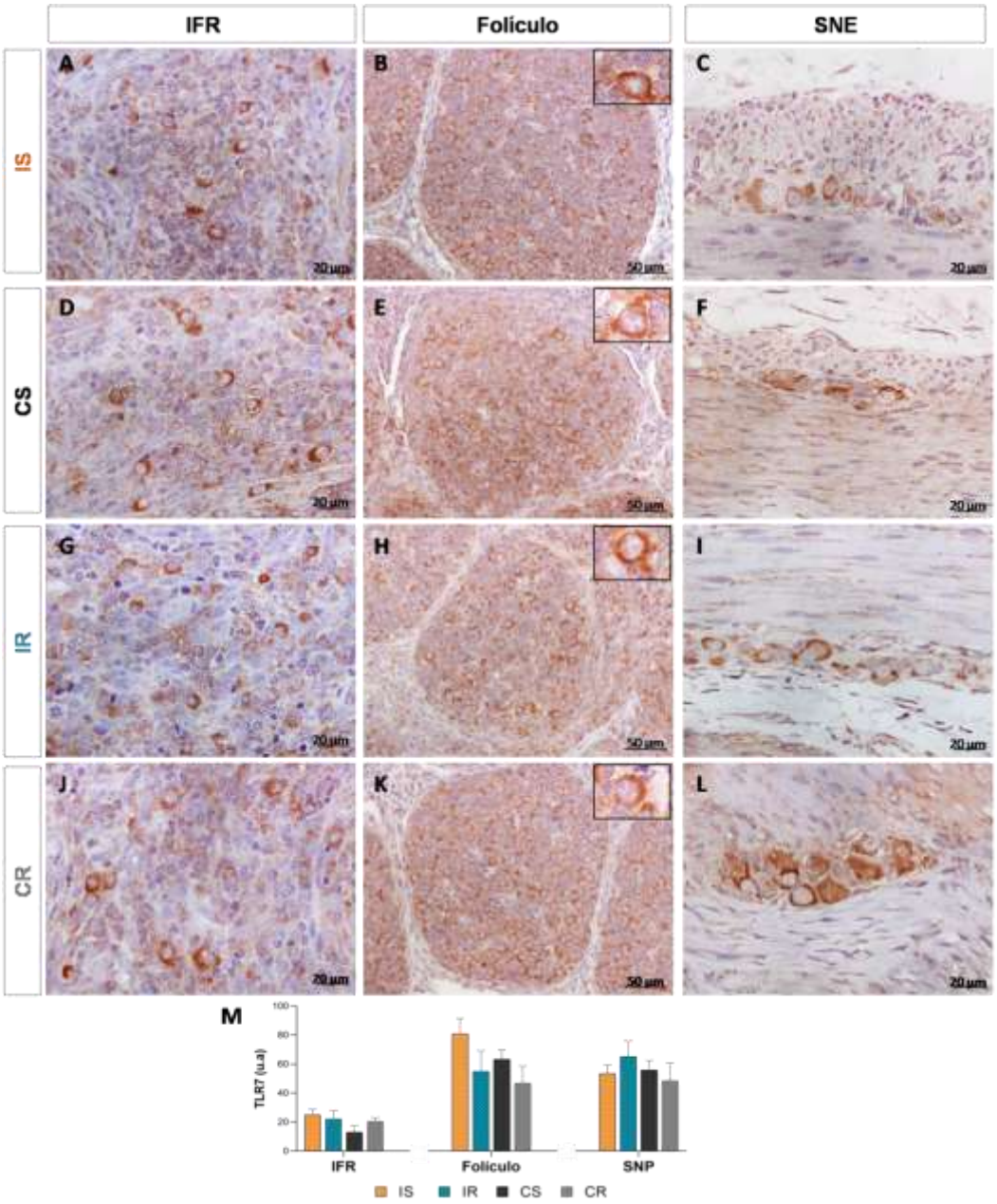


Figura 53. Detección del TLR7 mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) utilizando el anticuerpo primario ab124928 en el íleon de los cuatro grupos de corderos inoculados vía oral: infectados susceptibles (IS), controles susceptibles (CS), infectados resistentes (IR) y control resistentes (CR). Las imágenes reflejan la expresión del TLR7 en células localizadas en la región interfolicular (IFR) **(A, D, G, H)**, los folículos linfoides **(B, E, H, K)** y el plexo mientérico del sistema nervioso entérico (SNE). **(C, F, I, L). (M)** Representación gráfica del análisis semicuantitativo realizado con el software ImageJFiji.

DISCUSIÓN

1. La implicación de los TLR en la neuropatología de scrapie en infección natural

En los últimos años, el estudio de la respuesta neuroinflamatoria en las enfermedades priónicas ha permitido comprender mejor los mecanismos subyacentes y sus consecuencias. El concepto de neuroinflamación engloba el desarrollo de una respuesta inmunitaria innata en el SNC, caracterizada por una microgliosis y una astrogliosis reactiva en respuesta a un estímulo inflamatorio (Li et al., 2021). En las enfermedades priónicas esta respuesta neuroinflamatoria puede ser detectada antes incluso de la manifestación de los signos clínicos y precede a la espongiosis y la pérdida neuronal (Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020; Sandberg et al., 2014; Vincenti et al., 2015). Ahora bien, el efecto beneficioso o perjudicial de la activación microglial y astroglial sigue siendo objeto de debate. Así, mientras algunos autores argumentan que la activación y proliferación microglial contribuye al proceso neuroinflamatorio y la consiguiente neurodegeneración (Gomez-Nicola et al., 2013; Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020; Vincenti et al., 2015), otros subrayan el papel protector de la microglía a través de su capacidad, demostrada *in vitro,* para captar y degradar la PrP^{Sc} (Gilch et al., 2007; Kang et al., 2016). De acuerdo con estos hallazgos, estudios *in vivo* han demostrado que la depleción microglial acorta el periodo de supervivencia debido, probablemente, a la reducción en la degradación de la PrP^{Sc} (Carroll, Race, Williams, Striebel, et al., 2018; Zhu et al., 2016). De igual modo, asociada a la respuesta astroglial se ha detectado la activación de genes relacionados tanto con mecanismos proinflamatorios como antiinflamatorios frente al prion (Baskakov, 2021; Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020). Por todo ello, es posible que durante la enfermedad coexistan diferentes fenotipos gliales manifestando predominantemente un efecto neuroprotector/antiinflamatorio en las fases iniciales y neurotóxico/proinflamatorio en las fases más avanzadas de la enfermedad (Aguzzi & Zhu, 2017; Obst et al., 2017).

Una de las hipótesis propuestas para explicar la modulación fenotípica y funcional de las células gliales en las enfermedades priónicas, es la participación de los TLR en la activación y regulación de los mecanismos desencadenados por dichas células. Así, habiéndose demostrado que la PrP^{Sc} puede desencadenar directamente la activación de la microglía (Srivastava et al., 2018) y que la eliminación de proteínas agregadas o anormales, como por ejemplo el β-amiloide, está mediada por los TLR en las células microgliales (Chen et al., 2006; Jana et al., 2008; Tahara et al., 2006), resulta probable que en las enfermedades priónicas la activación crónica de los TLR esté detrás de la de la evolución de los distintos fenotipos gliales y sus efectos neuroprotectores y neurotóxicos (Sinha et al., 2021; Tang et al., 2008; Walter et al., 2007). Sin embargo, actualmente se desconoce en gran medida qué papel juegan los TLR en la patogenia de las enfermedades priónicas. Por ello, en nuestro estudio se analizan por primera vez estos receptores en la especie ovina infectada de forma natural con scrapie así como su correlación con las características neuropatológicas de la enfermedad.

Las cuatro regiones neuroanatómicas estudiadas en las ovejas infectadas con scrapie y control mostraron diferencias significativas en los depósitos de PrP^{Sc}, la espongiosis, la astrogliosis y la microgliosis. Estas diferencias eran más evidentes en la región más caudal analizada, la médula oblongada, mientras que la región más rostral, la corteza frontal, las lesiones eran leves. Esta reducción en la severidad de las lesiones en dirección rostral concuerda con la ruta de

neuroinvasión y diseminación seguida por el prion en el SNC, comenzando por la médula espinal y el óbex, y alcanzando en último lugar la corteza frontal (Andreoletti et al., 2000; Ligios et al., 2002; Wemheuer et al., 2011). No obstante, considerando la proximidad anatómica existente entre el tálamo y el hipocampo, las conexiones nerviosas de tipo aferente y eferente entre ambas regiones y la ruta de neuroinvasión del prion, resulta llamativa la gran diferencia detectada entre ambas regiones respecto a la cantidad de depósitos de PrP^{Sc} y el grado de vacuolización. Estos resultados concuerdan con las diferencias descritas en la cantidad de depósitos de PrP^{Sc} y la vacuolización entre el hipocampo y el tálamo en ratones infectados vía intracerebral con scrapie (Makarava et al., 2019) y muestran importantes similitudes con las lesiones observadas en el hipocampo de casos humanos con ECJ donde la leve vacuolización y astrogliosis tampoco se correlacionan con los depósitos de PrP^{Sc} (Kaneko et al., 2008; Masullo & Macchi, 1997). Consecuentemente, las leves lesiones descritas en el hipocampo de las ovejas infectadas con scrapie en este estudio y anteriores ((Ligios et al., 2002; Vidal et al., 2009) y en otras especies con diversas enfermedades priónicas (Kaneko et al., 2008; Makarava et al., 2019; Masullo & Macchi, 1997), indican que esta región podría estar protegida de algún modo de la neurotoxicidad del prion, bien porque las características bioquímicas de los depósitos sean diferentes a las del resto de áreas del cerebro (Kaneko et al., 2008; Makarava, Chang, & Baskakov, 2020; Srivastava et al., 2018) y/o porque las neuronas de esta región sean más resistentes a la neurodegeneración (Majer et al., 2012). Por ello, el hallazgo exclusivamente en el hipocampo de las ovejas infectadas con scrapie de una morfología microglial, conocida como microglía en bastón, próxima a las neuronas piramidales CA3 resulta especialmente relevante ya que, aunque por el momento no se conocen con exactitud los marcadores fenotípicos específicos y las funciones de este tipo de microglía, su frecuente localización junto a neuronas dañadas sugiere una función neuroprotectora (Au & Ma, 2017; Giordano et al., 2021; Taylor et al., 2014). Hasta la fecha esta morfología microglial solo había sido descrita una vez en las enfermedades priónicas en pacientes con ECJ (Garces et al., 2021), pero en otras enfermedades neurológicas como la epilepsia, la DCL, el HT y el AD, se ha convertido en un hallazgo común, especialmente en la corteza cerebral y el hipocampo donde las lesiones son más moderadas (Bachstetter et al., 2015; Holloway et al., 2019; Wyatt-Johnson et al., 2017). De hecho, no es esperable la presencia de este tipo de microglía asociada a lesiones graves ya que, en dichas condiciones, evoluciona hacia una morfología ameboide (Tam & Ma, 2014). Por ello, la presencia de microglía en bastón en el hipocampo que no se observa en otras regiones y que aparece principalmente en aquellos animales en fase clínica incipiente de scrapie podría ser un mecanismo neuroprotector propio del hipocampo que, a su vez, explicaría la escasa pérdida neuronal observada en dicha área.

Paralelamente, el análisis de los *TLR* reveló una correlación entre la severidad de las lesiones y el incremento de su expresión génica, coincidiendo con el patrón caudo-rostral de lesiones anteriormente descrito. De este modo, la región más caudal y con mayores lesiones mostraba también un mayor número de *TLR* sobreexpresados, mientras que en la región más rostral, la corteza frontal, solo el *TLR4* estaba incrementado. Además, el incremento tanto a nivel génico como proteico del *TLR4* fue un hallazgo común en todas las regiones analizadas independientemente de la severidad de las lesiones. Por ello, teniendo en cuenta que la expresión del TLR4 se ha descrito en células microgliales (Cui et al., 2020; Lee et al., 2019), que

los primeros signos de la microgliosis pueden ser detectados en fases muy tempranas de la neuroinvasión y que la mayoría de los genes cuya expresión aumenta en las enfermedades priónicas parecen estar asociados con la activación microglial (Vincenti et al., 2015), resulta muy probable que el incremento del *TLR4* en las ovejas infectadas con scrapie esté asociado con la microgliosis detectada en las mismas. Ahora bien, según la fase clínica y la gravedad de las lesiones, la activación del TLR4 en las células microgliales podría tener un efecto neuroprotector (Spinner et al., 2008), incrementando la fagocitosis de la PrP^{Sc} de un modo similar a lo descrito para la captación del amiloide β (Tahara et al., 2006), o podría tener un efecto neurotóxico, incrementando la respuesta proinflamatororia (Fiebich et al., 2018).

El incremento en la expresión génica del *TLR7* detectado en la médula oblongada de las ovejas infectadas con scrapie ya había sido descrito en el SNC de modelos murinos con enfermedades priónicas y en pacientes con ECJ (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018; Llorens et al., 2014; Saba et al., 2012). La activación del TLR7 está asociada con la respuesta proinflamatoria de la microglía y con el desencadenamiento de la muerte neuronal por apoptosis (Lehmann et al., 2012; Rosenberger et al., 2014), un mecanismo que se ha demostrado activado precisamente en las neuronas de la méduda oblongada de ovejas infectadas con scrapie (Hedman et al., 2012). Por tanto, el aumento del *TLR7* en la médula oblongada de las ovejas infectadas con scrapie, la región donde se detectaron los niveles más altos de espongiosis, depósitos de PrP^{Sc} y gliosis, podría estar mediando la activación microglial hacia un fenotipo proinflamatorio y el desencadenamiento de la apoptosis neuronal.

Respecto al TLR1, por el momento se desconoce en gran medida cuál es su papel en las enfermedades neurodegenerativas. Por el contrario, la participación del TLR2 en la activación microglial está ampliamente demostrada en la ELA, la MS y el AD (Letiembre et al., 2009; Prinz et al., 2006). Sin embargo, en las enfermedades priónicas el papel del TLR2 todavía no está claro porque existen resultados algo contradictorios. Por un lado, la disminución en el periodo de supervivencia de ratones KO para el TLR2 inoculados vía intracerebral con scrapie podría indicar un papel protector por parte de este receptor en la progresión de la patogenia (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018). Sin embargo, recientemente se ha descrito que el incremento en la expresión del *TLR2 y CD68* (un receptor lisosomal asociado a la fagocitosis de la microglia reactiva) en células microgliales aisladas del encéfalo de ratones infectados con scrapie, es característica de un estado de activación neurotóxico de la microglía en el que su capacidad fagocítica está descontrolada y elimina indistintamente sinapsis y neuronas tanto dañadas como viables (Kushwaha et al., 2021; Sinha et al., 2021). Por esta razón, el incremento en la expresión del *TLR2 y CD68* en la médula oblongada de las ovejas infectadas podría ser indicativo de una respuesta microglial neurotóxica que, a su vez, concuerda con la presencia de las lesiones más severas y una gran cantidad de microglía ameboide.

De forma global, los resultados de la expresión génica en el hipocampo de las ovejas infectadas muestran un patrón opuesto al detectado en las otras regiones debido a la disminución en la expresión del *TLR1, TLR2, MyD88 y CD14*, y a la ausencia de alteraciones en las citoquinas analizadas. Este patrón podría ser indicativo de un ambiente neuroprotector ya que se ha descrito que la deficiencia del *TLR2* en cultivos microgliales primarios y estimulados con el péptido neurotóxico PrP1026-126 modifica la activación microglial pasando de un fenotipo

neurotóxico a uno neuroprotector (Wang et al., 2015). Asimismo, la reducción en la expresión de *CD14,* un coreceptor del TLR4 esencial para su internalización*,* también podría ser beneficiosa dado que la depleción de *CD14* en modelos murinos infectados con priones alarga su periodo de supervivencia, retrasa la acumulación de PrP^{Sc} en sus encéfalos y aumenta la expresión de citoquinas antiinflamatorias mientras reduce la expresión de las proinflamatorias (Sakai et al., 2013). Por otro lado, el hecho de que el hipocampo de las ovejas con scrapie fuese la única región donde la expresión de *CD36* no estaba aumentada, es un hallazgo que podría tener también consecuencias neuroprotectoras ya que CD36 es un receptor scavenger de clase B asociado con el estatus proinflamatorio microglial (Noda & Suzumura, 2012). Además, en las enfermedades priónicas se ha demostrado que la estimulación de cultivos BV-2 (un modelo *in vitro* microglial) con PrP106-126, aumenta la expresión de *CD36* y la producción de citoquinas proinflamatorias como iNOs y NO (Kouadir et al., 2012; Kouadir et al., 2011). Por otro lado, se ha descrito que el reconocimiento de amiloide-β por parte de CD36 desencadena la formación del complejo heterotrimérico, CD36-TLR4-TLR6, que activa la respuesta inmune innata (Shmuel-Galia et al., 2017; Stewart et al., 2010). Consecuentemente, la detección en nuestro estudio del incremento de *CD36, TLR4* y *TLR6* en las áreas más dañadas, la médula oblongada y el tálamo, podría ser indicativo de la participación de dicha triada en el desencadenamiento de la respuesta proinflamatoria microglial.

Los hallazgos descritos en el hipocampo de las ovejas con scrapie sugieren que la microglía podría responder frente al prion de un modo diferente en esta región, aunque queda por esclarecer las causas de este comportamiento particular. Hasta hace unos años estas peculiaridades observadas en el hipocampo se hubieran justificado argumentado diferencias en el tipo de cepa priónica y su tropismo celular, sin embargo, estudios recientes indican que el grado de activación de la respuesta glial (Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020), especialmente en las fases preclínicas, y/o el tipo de respuesta glial (Alibhai et al., 2016; Makarava et al., 2019) podría variar según la región del SNC, influyendo en la vulnerabilidad de ciertas regiones a la neurodegeneración. Se ha demostrado que la respuesta inflamatoria de la microglía está regulada por los niveles de sialilación de la PrP^{Sc} (Brown & Neher, 2014; Fernandez-Arjona et al., 2017; Linnartz et al., 2012; Srivastava et al., 2018) y que dichos niveles son variables en cada región (Makarava, Chang, & Baskakov, 2020), siendo más altos en el hipocampo y en la corteza respecto al tálamo y tronco del encéfalo (Makarava, Chang, & Baskakov, 2020). Como consecuencia, en aquellas regiones donde los niveles de sialización de la PrP^{Sc} son más bajos, la respuesta proinflamatoria microglial es mayor (Srivastava et al., 2018) y la replicación del prion es más eficiente (Katorcha et al., 2014). De este modo, los niveles de sialilación podrían explicar, al menor en parte, la menor susceptibilidad del hipocampo a la neurodegeneración detectada en este y otros estudios. Sin embargo, el estudio de la respuesta glial desencadenada en las enfermedades priónicas sigue siendo el objeto de numerosas investigaciones y por el momento sigue sin comprenderse bien qué desencadena su activación y cómo responde frente al prion.

En resumen, nuestros resultados demuestran una neuropatología particularmente leve en el hipocampo de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie, caracterizada por bajos niveles de espongiosis, escasos depósitos de PrP^{Sc} y una débil astrogliosis que contrasta con las

lesiones esperadas según la progresión caudo-rostral del scrapie. Además, la presencia en el hipocampo de una morfología microglial singular, la microglía en bastón, que podría desempeñar funciones neuroprotectoras (Au & Ma, 2017), junto con las cambios en los patrones de expresión génica en los *TLR* y otras moléculas asociadas a la neuroinflamación, diferencian aún más a esta región del cerebro respecto a las otras analizadas en las ovejas infectadas con scrapie. Estas peculiaridades sugieren la existencia de un ambiente neuroprotector en el hipocampo frente a la infección natural con priones que sería de gran interés investigar con mayor profundidad.

Por último, aunque se ha progresado enormemente en la caracterización fenotípica de la glía en las enfermedades neurodegenerativas utilizando modelos murinos, existen dudas sobre si estos modelos experimentales simulan fielmente los aspectos clave de estas enfermedades priónicas y se cuestiona cuán extrapolables son sus resultados a la patología desarrollada por grandes animales o incluso humanos (Dawson et al., 2018; Watts & Prusiner, 2014). Nuestros resultados utilizando el modelo murino transgénico tg338, utilizado en numerosos estudios para analizar la patogenia de scrapie ovino, corroboran el desarrollo de los signos patológicos típicos de la infección por priones, incluyendo el depósito de PrP^{Sc}, la espongiosis del neuropilo, la astrogliosis y la microgliosis. Asimismo, los ratones tg338 infectados mostraron un incremento significativo del *TLR1* y *TLR2* y un aumento próximo a la significancia del *TLR7*. Si bien el incremento en la expresión de estos genes ya había sido descrita anteriormente en otros modelos murinos infectados con scrapie (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018; Saba et al., 2012), este patrón de expresión contrasta con nuestros resultados en las ovejas infectadas de forma natural. En concreto, en el cerebro de los ratones no se detectó el incremento en la expresión del *TLR4*, precisamente el gen que mayores diferencias de expresión mostró en las ovejas infectadas respecto a las control. Es posible que estos hallazgos contradictorios sean consecuencia de la diferente vía de infección y/o de los niveles de expresión de la proteína priónica en ratones tg338 (Langevin et al., 2011; Le Dur et al., 2017). En cualquier caso, nuestros resultados indican que la inoculación intracerebral de ratones tg338 con scrapie no reproduce la respuesta inmunitaria observada en la infección natural con scrapie.

2. La participación del TLR4 en la respuesta a nivel de la barrera intestinal frente al prion en infección natural

Es ampliamente conocido que en las EET adquiridas que afectan a los animales la principal vía de entrada del prion es la vía oral y que, una vez atraviesa el prion la barrera intestinal, la infección se instaura en el GALT y/o los nódulos linfáticos que drenan el intestino. Una vez ahí, los niveles de PrP^{Sc} aumentan en el tejido linfoide hasta alcanzar un nivel constante en el que la cantidad de los depósitos de PrP^{Sc} deja de incrementarse y se estabiliza (Tabouret et al., 2010). Esa fase se cree que se alcanza cuando se establece un equilibrio entre la cantidad de PrP^{Sc} nueva generada en las CDF, que sirven de sustento para la replicación y la acumulación del prion (K. L. Brown et al., 1999; McCulloch et al., 2011; Montrasio et al., 2000), y la cantidad que fagocitan y degradan los macrófagos (Maignien et al., 2005; McGovern et al., 2009). Esta primera fase de infección resulta crucial para alcanzar un umbral mínimo que permite al prion comenzar

su ruta de neuroinvasión infectando primero el SNE para ascender, a través del SNP, hasta el SNC. En el íleon de las ovejas adultas infectadas con scrapie, no se observaron lesiones macroscópicas ni histopatológicas asociadas a la infección más allá de los depósitos de PrP^{Sc} en tejido linfoide y el SNE de acuerdo con estudios previos (Herrmann et al., 2003; McGovern & Jeffrey, 2007). No obstante, el inmunomarcaje de macrófagos y CDF mostró un incremento leve en las ovejas con scrapie en fase clínica incipiente y significativo en las ovejas en fase clínica avanzada respecto al grupo control. Si bien el incremento del inmunomarcaje de Iba-1 en las ovejas infectadas parece estar causado por el aumento en el número de macrófagos en las PP ileales, un incremento que ya se ha descrito en los folículos linfoides de ratones infectados con scrapie (McGovern et al., 2004), el de las CDF podría estar generado por una mayor ramificación de sus dendritas, una alteración morfológica también descrita en ovejas infectadas con scrapie (McGovern & Jeffrey, 2007). Así, aunque durante la fase de linfoinvasión el prion no induce una respuesta inmune específica (Porter et al., 1973; Prusiner, 1982), nuestros hallazgos evidencian la activación de la respuesta inmune innata en las PP del íleon de las ovejas.

Hasta la fecha, pocos estudios han descrito alteraciones en la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune u otros mecanismos en el tejido linfoide de las ovejas infectadas con scrapie (Filali et al., 2014; Gossner et al., 2011; Gossner & Hopkins, 2015; Sorby et al., 2009) y en particular en el íleon (Austbo et al., 2007; Austbo et al., 2008; Skretting et al., 2004). Por ello, teniendo en cuenta el papel tan importante de las PP y el SNE en la replicación y neuroinvasión del prion que penetra vía oral (Mabbott & MacPherson, 2006) y la presencia de depósitos de PrP^{Sc} en ambos tejidos en el íleon de la ovejas infectadas naturalmente con scrapie, se examinó el íleon para determinar si, al igual que ocurre en SNC, se producen cambios en los *TLR* y otros genes relacionados con ellos.

Los análisis de expresión génica mostraron un gran incremento del *TLR4* en el íleon de las ovejas infectadas, tanto en la fase clínica incipiente como más avanzada de la enfermedad. Este resultado refleja que la continua acumulación y replicación del prion en el íleon de las ovejas no pasa desapercibida para el sistema inmunitario ni genera una respuesta de tolerancia inmunológica. Por el contrario, la acumulación del prion induce un incremento de la expresión del *TLR4* de forma sostenida, similar a la detectada en el SNC donde el *TLR4* fue también el gen que mayores diferencias de expresión mostró entre las ovejas infectadas y control.

Respecto al tipo celular que podría ser el responsable de la sobreexpresión del *TLR4* en el íleon, una de las principales células candidatas, de acuerdo con nuestros resultados y la literatura, resulta ser el macrófago (Vaure & Liu, 2014). El incremento en la inmunotinción de Iba-1 en las ovejas infectadas, el hallazgo de patrones de depósito de PrP^{Sc} asociados con macrófagos y, especialmente, el inmunomarcaje del TLR4 en células compatibles morfológicamente con macrófagos, son resultados que respaldan la implicación de los macrófagos en el incremento del *TLR4* detectado en el íleon. Además, siendo el TLR4 un marcador celular específico del fenotipo M1 de los macrófagos (Shapouri-Moghaddam et al., 2018) y teniendo en cuenta la capacidad de los macrófagos para degradar el prion (Beringue et al., 2000), es muy probable que su sobreexpresión esté relacionada con un aumento de la fagocitosis de los macrófagos en estas circunstancias de infección (Wang et al., 2018).

No obstante, no se puede descartar que los depósitos de PrP^{Sc} detectados en las CDF y en el SNE en nuestro estudio estén involucrados en el incremento de la expresión del *TLR4* ya que, tanto las CDF (El Shikh et al., 2007; Heesters et al., 2021), como las neuronas del plexo mientérico (Barajon et al., 2009; Rumio et al., 2006) y las células gliales entéricas (Turco et al., 2014), expresan este receptor. Las funciones que desempeña el TLR4 en estas células son diversas pero, en esencia, están siempre relacionadas con la respuesta inmunitaria. Así, la activación del TLR4 en las CDF induce un incremento en la expresión de moléculas de adhesión para facilitar la interacción de las CDF con los linfocitos B (El Shikh et al., 2007; Garin et al., 2010), mientras que en las neuronas del SNE actúa en la regulación de las funciones neuromusculares que controlan la motilidad intestinal (Anitha et al., 2012; Caputi et al., 2017). A su vez, en las células gliales entéricas la estimulación del TLR4 causa su activación para proteger a las neuronas entéricas y facilitar los mecanismos de señalización del SNE (Caputi et al., 2017; Cerantola et al., 2020). Tal es la importancia del TLR4 en la respuesta inmunitaria del intestino que su inhibición a nivel genético (ratones $TLR4^{-/-}$) (Iiyama et al., 2003) o su bloqueo a nivel proteico (utilizando anticuerpos) (Garin et al., 2010), causa una reducción significativa en el tamaño y número de las PP y afecta negativamente a la respuesta humoral. Por este motivo, el incremento de la expresión del *TLR4* mantenida a lo largo de la infección con scrapie en las ovejas podría estar relacionada con la disminución en el grado de involución normal del tejido linfoide intestinal (Gonzalez et al., 2006) y/o con la mayor proporción de folículos linfoides secundarios detectados en las tonsilas y linfonodos de ovejas infectadas con scrapie (McGovern & Jeffrey, 2007).

Por otro lado, la sobreexpresión del *TLR4* y de *Trif* en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie sugiere que el *TLR4* podría estar activando la vía independiente de MyD88. No hay que olvidar que, a diferencia del resto de TLR, el reconocimiento de un ligando por parte del TLR4 puede desencadenar dos tipos de respuesta (Kawasaki & Kawai, 2014); la vía dependiente de MyD88, que culmina con la inducción de los factores de transcripción (NF-κβ y AP-1) que inducen la producción de citoquinas proinflamatrias (Molteni et al., 2016), y la vía dependiente de TRIF (Kagan et al., 2008), en la que el TLR4 forma un complejo con su ligando y MD-2, se internaliza y utiliza su dominio TIR para activar a TRIF y seguidamente a IRF3, culminando con la producción de INF-I y de NF-κβ (Stephens et al., 2021). Ahora bien, estas vías no se pueden desencadenar simultáneamente ya que se inician en lugares diferentes de la célula, la primera en la superficie celular y la segunda en los endosomas. Por tanto, la activación de la vía dependiente de TRIF es consecutiva a la activación de la vía MyD88 (Ciesielska et al., 2021; Kagan et al., 2008). Por ello, la sobreexpresión de *Trif* sugiere la localización del TLR4 en compartimentos intracelulares, una localización propia del fenotipo M1 de los macrófagos y que concuerda con la fagocitosis del prion (Stephens et al., 2021). Por el momento se desconoce en gran medida la importancia de la vía dependiente de TRIF en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas, pero los resultados publicados apuntan a que la depleción de *IRF3*, uno de sus principales factores de transcripción, o de *TRIF,* acelera, respectivamente, la progresión del scrapie (Ishibashi et al., 2012) y otras enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Komine et al., 2018).

De este modo, el incremento en la expresión génica y proteica del TLR4 detectada por primera vez tanto en el SNC como en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie concuerda con los resultados del único estudio publicado en el que se utiliza el modelo ovino en el que se detectó el incremento de la expresión del *TLR4* a las 23 semanas postinoculación en la sangre de corderos inoculados con scrapie en fase neonatal (Meling et al., 2018).

Ante la clara implicación del TLR4 en la patogenia del scrapie que muestran nuestros resultados, y teniendo en cuenta que ratones KO para el TLR4 infectados con priones muestran una reducción del periodo de supervivencia, sería interesante determinar la posible utilidad de dicho receptor como diana terapéutica. Entre las moléculas que intervienen en la regulación del TLR4 y cuyo uso con fines terapéuticos sería interesante analizar en las enfermedades priónicas está TAK-242 (Resatorvid), una molécula de bajo peso molecular y liposoluble capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (Hua et al., 2015). TAK-242 actúa reduciendo la actividad del TLR4 uniéndose a su dominio intracelular para impedir su asociación con TIRAP o TRAM (Matsunaga et al., 2011). Esta molécula ya ha sido probada en un modelo murino para el estudio del alzhéimer y ha demostrado su eficacia al inhibir las cascadas intracelulares mediante las que el TLR4 induce la respuesta proinflamatoria, además de reducir la polarización de la microglía hacia su fenotipo M1, aumentar la capacidad fagocítica microglial y reducir la apoptosis neuronal (Cui et al., 2020). Asimismo, TAK-242 también ha demostrado tener efectos beneficiosos en modelos murinos para el estudio del ELA (Fellner et al., 2017) y en otros trastornos nerviosos asociados igualmente a la activación del TLR4 (Hua et al., 2015; Moser et al., 2018). Pero además, TAK-242 también se ha probado en la especie ovina con buenos resultados para el tratamiento de lesiones agudas renales inducidas por endotoxemias en las que la activación del TLR4 también está implicada (Fenhammar et al., 2011). Este escenario resulta realmente prometedor y abre las puertas al desarrollo de estrategias terapéuticas que utilicen TAK-242, u otras moléculas similares, para reducir el impacto de la activación del TLR4 sobre la neuroinflamación en el scrapie clásico y, en el futuro, en otras enfermedades priónicas.

Sin embargo, en paralelo al desarrollo de estrategias terapéuticas inhibidoras de la respuesta proinflamatoria desencadenada por la activación del TLR4, también sería importante descubrir qué mecanismos reguladores de dicho receptor pueden estar fallando en las enfermedades priónicas. Afortunadamente ya se han descrito numerosos mecanismos reguladores del TLR4, entre los que cabe citar: receptores solubles (sTLR4), reguladores transmembrana, reguladores del tráfico celular, proteínas adaptadoras (como MyD88 y Tollip), mecanismos de ubiquitinación y fosforilación, reguladores transcripcionales y mecanismos de retroalimentación negativa (Vazquez-Carballo et al., 2021). Entre todos los mecanismos reguladores citados, cabe destacar la proteína Rab7, clasificada como reguladora del tráfico celular y que, por su nexo con las enfermedades priónicas y la regulación del TLR4, merece especial atención.

Para entender el nexo entre el Rab7, el TLR4 y las enfermedades priónicas, es necesario explicar el tránsito intracelular del TLR4. De un modo breve, tras la internalización del TLR4, éste pasa a localizarse en endosomas tempranos (donde activa la vía dependiente de TRIF) y posteriormente en endosomas de reciclaje (para ser reutilizado y transportado de nuevo a la membrana plasmática) o en endosomas tardíos (para fusionarse con lisosomas y ser degradado) (Figura 54) (Ali et al., 2019; Wang et al., 2007). Por ello, la internalización del TLR4 resulta

ineludible para dos mecanismos; la activación de la vía dependiente de TRIF y la inactivación del TLR4 mediante su destrucción o su reciclaje.

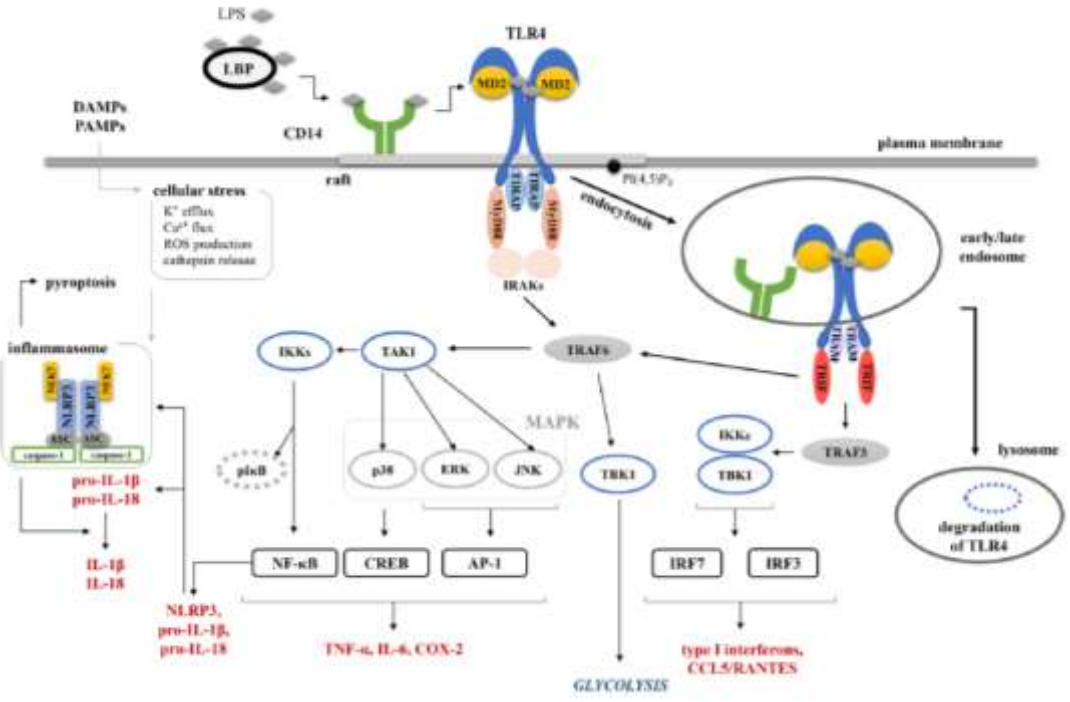


Figura 54. Esquema de la activación secuencial de la vía dependiente de MyD88 tras la estimulación del TLR4, seguida de la internalización del TLR4 en compartimentos endosomales para activar la vía dependiente de TRIF y finalmente ser degradado en los lisosomas (Ciesielska et al., 2021).

La degradación lisosomal es un punto crítico para la regulación del TLR4 ya que, si se acumula en compartimentos endosomales, puede intensificar la respuesta proinflamatoria activando de forma prolongada las vías de señalización de NF-κβ, MAPK e IRF3 (Bruscia et al., 2011). En ese punto crítico interviene Rab7b, una pequeña GTPasa localizada en los endosomas tardíos y los lisosomas, que regula el de tránsito de diferentes receptores hacia su degradación lisosomal en las últimas fases del proceso de endocitosis (Zhang et al., 2009). Uno de los receptores cuyo tránsito regula Rab7b, desde los endosomas tempranos hacia los endosomas tardíos, es el TLR4. Por ello, Rab7b se considera un inhibidor de los mecanismos desencadenados tanto por la vía dependiente MyD88 como TRIF y por tanto, cualquier problema asociado con ella puede desequilibrar los mecanismos activados por el TLR4 (Wang et al., 2007). Recientemente se ha demostrado que la infección con priones reduce la cantidad de Rab7 y, consecuentemente, la maduración de los lisosomas y su capacidad de degradación (Shim et al., 2016). Esta reducción en los niveles de Rab7 conlleva una menor degradación de la PrP^{Sc} y su acumulación en endosomas, precisamente uno de los lugares donde se produce la conversión de la proteína prion favoreciendo la propagación de este agente (Marijanovic et al., 2009; Yim et al., 2015). Pero a su vez, conociendo la importancia de Rab7 para la degradación del TLR4, es muy probable que la disminución en los niveles de Rab7 repercuta en la cronicidad de la respuesta proinflamatoria desencadenada por el TLR4 en las enfermedades priónicas.

Por todo ello, habiendo demostrado el incremento de la expresión génica y proteica del TLR4 en ovejas infectadas con scrapie y anteriores estudios en pacientes con ECJ (Areskeviciute et al.,

2020; Llorens et al., 2014), el análisis de TAK-242 y Rab7 en las enfermedades priónicas supone dos potenciales vías de investigación en la regulación del TLR4.

En relación al *TLR9,* por el momento resulta complejo explicar su reducción en la expresión génica en el íleon de las ovejas infectadas con scrapie. Hasta la fecha los únicos estudios publicados sobre el TLR9 en las enfermedades priónicas están enfocados hacia el desarrollo de estrategias profilácticas (Sethi et al., 2002) o inmunoterapias (Rosset et al., 2004; Spinner et al., 2007) utilizando ligandos del TLR9 como estimuladores de la respuesta inmune. Estos estudios revelaron que la estimulación del TLR9 durante un periodo breve postexposición al prion, podía alargar la supervivencia de los ratones inoculados vía intraperitoneal con scrapie y que el uso de agonistas del TLR9 como adyuvantes permitía superar la tolerancia inmunológica frente a la PrP^{Sc} y generar una respuesta humoral. Sin embargo, en condiciones naturales se ha comprobado que la infección con scrapie induce una supresión en los niveles de expresión de hasta el 70% de los genes analizados por transcriptómica en el tejido linfoide de las ovejas (Filali et al., 2014; Gossner & Hopkins, 2015). Por tanto, es posible que la reducción en la expresión del *TLR9* en nuestro caso sea resultado de algún mecanismo de evasión o bloqueo de la respuesta inmunitaria inducida por el prion.

La ausencia de cambios en la expresión génica de las citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias en el íleon de las ovejas infectadas con scrapie contrasta con el resto de resultados encontrados, desde el incremento en el inmunomarcaje de macrófagos y CDF, hasta la notable sobreexpresión del *TLR4.* Sin embargo, el hecho de que esos mediadores inflamatorios no estén incrementados en el íleon concuerda con la ausencia de lesiones en el intestino debidas a la infección con scrapie (Herrmann et al., 2003; McGovern & Jeffrey, 2007). La ausencia de cambios en la expresión de las citoquinas apunta a la existencia de algún mecanismo regulador que está controlando la respuesta inflamatoria. Por este motivo, se analizó la expresión génica de *Tollip,* un gen que codifica una proteína intracelular reguladora de la respuesta inmunitaria desencadenada por los TLR2 y TLR4 (Zhang & Ghosh, 2002) y cuya expresión anteriormente había sido detectada incrementada en el intestino de ratones estimulados con una proteína PrP recombinante (Dervishi et al., 2015). Sin embargo, en nuestro caso no detectamos alterada la expresión de *Tollip*.

En conclusión, los resultados obtenidos en ambos tejidos diana en la infección natural de scrapie, el SNC e íleon, permiten confirmar la participación de los TLR en la patogenia del scrapie tanto a nivel periférico como a nivel central, destacando el TLR4 como principal TLR involucrado con una sobreexpresión del mismo de forma sostenida en la enfermedad. Además, estos hallazgos ponen en evidencia una posible modulación de la respuesta neuroinflamatoria en la patogenia del scrapie mediante los TLR y dejan abiertas importantes incógnitas sobre qué tipos celulares están detrás de la activación del TLR4 y cuáles son exactamente sus funciones en la respuesta desencadenada frente al prion.

3. La función del TLR7 y 5 en infección experimental con scrapie vía oral en el hospedador natural y en ratones C57BL/6.

Desentrañar los mecanismos moleculares que intervienen en las fases tempranas de la infección vía oral con scrapie y cómo influyen dos de los factores más importantes para la susceptibilidad a la enfermedad, la edad (St Rose et al., 2007) y el genotipo para el gen *PRNP* (Diaz et al., 2005; Hunter, 1997), son claves para comprender cómo el prion consigue eludir la respuesta inmunitaria e instaurar la infección en el hospedador. Por este motivo, una vez confirmada la implicación de los TLR en la patogenia de la enfermedad natural, se investigó su papel en el punto y momento de entrada del agente causal. Para ello se analizó el íleon de ratones C57BL/6, corderos neonatos y ovejas adultas a las pocas horas postinoculación vía oral con scrapie.

Por el momento, no se ha logrado detectar PrP^{Sc} mediante técnicas IHQ antes de la tercera semana postinoculación vía oral de corderos u ovejas con scrapie (Gonzalez, et al., 2014; Heggebo et al., 2003; Ryder et al., 2009). De hecho, la primera señal inmunohistoquímica de PrP^{Sc} ha sido descrita en las PP de corderos VRQ/VRQ a los 18 días postinoculación vía oral con scrapie (Tabouret et al., 2010). En nuestro estudio tampoco se detectaron depósitos de PrP^{Sc} en el íleon de los corderos o de las ovejas a las 48 y 65 horas postinoculación con scrapie. No obstante, las altas tasas de infección logradas en otros estudios en ovinos con genotipo susceptible, usando dosis de inoculación más bajas que la utilizada en nuestro caso en corderos (Hamir et al., 2009) y en ovejas (Foster, Parnham, Chong, et al., 2001; O'Rourke et al., 1997), permiten suponer que los animales recibieron una dosis capaz de infectar a un alto porcentaje de los mismos.

El inmunomarcaje de macrófagos y CDF tampoco mostró diferencias en el íleon de los corderos o las ovejas inoculadas vía oral con scrapie respecto a sus controles. No obstante, el inmunomarcaje de las CDF sí que evidenció diferencias entre los dos estadios ontogénicos, mostrando una cantidad bastante superior de estas células en los folículos de los corderos respecto a las ovejas. La abundancia de CDF detectada en corderos tan jóvenes contrasta con otras especies, como por ejemplo la murina, que no desarrollan estas células hasta que se produce un contacto con un antígeno que desencadena el desarrollo de un CG (Halleraker et al., 1994). Pero la especie ovina es un caso particular y ya en el último tercio de la gestación sus folículos primarios poseen CDF, macrófagos, CD y linfocitos. Ahora bien, a diferencia de las CDF maduras que se localizan principalmente en los CG de los folículos de las ovejas adultas, las CDF de los folículos primarios de los corderos neonatos son inmaduras, por lo que no presentan la morfología ramificada característica de su estado maduro (Halleraker et al., 1994). Esta diferencia en la cantidad de CDF entre los corderos y las ovejas puede ser uno de los factores determinantes de la susceptibilidad al scrapie ya que se trata de células claves para la replicación y acumulación del prion (Montrasio et al., 2000; Prinz et al., 2002).

Así pues, aunque los resultados inmunohistoquímicos no mostraron diferencias entre los grupos de corderos y ovejas infectados con scrapie y control, el análisis de la expresión génica y proteica de los TLR sí que reveló el incremento del *TLR7* en el íleon de los corderos inoculados con scrapie. Además, a pesar de que el estudio de la expresión génica de los *TLR* en el SNC de

los ratones tg338 no mostró grandes similitudes con el modelo ovino de infección natural, en este caso, los dos modelos animales, ratones C57BL/6 y corderos, sí que respondieron de forma similar a la inoculación vía oral con scrapie ya que tanto en los ratones como en los corderos se detectó el incremento del *TLR7* y *TNFα* en los grupos infectados. Hasta el momento tan solo dos estudios habían tratado de detectar cambios en la expresión génica en el íleon de ovinos infectados vía oral con scrapie clásico pero ninguno había centrado su análisis en el momento en de la captación del prion, es decir, durante las primeras horas postinfección. En 2004 se publicó el primer estudio en el que se detectaron 25 genes alterados en corderos de 6-8 semanas de edad a los 7 días postinoculación, la mayoría relacionados con genes codificantes de proteínas ribosómicas y mitocondriales (Skretting et al., 2004). Posteriormente, otro estudio investigó la expresión génica de la *PrP* en corderos de la misma edad inoculados vía oral y eutanasiados entre la semana 1 y 5 postinoculación, pero no detectó diferencias entre los que recibieron el inóculo con scrapie y los controles (Austbo et al., 2007).

Al considerar el efecto del genotipo en la sobreexpresión del *TLR7* detectada en el íleon de los corderos, se observa que su expresión aumenta tanto en los corderos IS como IR respecto a sus controles (CS y CR) pero la diferencia de expresión solo resulta ser estadísticamente significativa al comparar los IS y CS. De forma similar, la expresión proteica de la forma activada del TLR7 analizada por WB también es mayor en los corderos IS e IR respecto a sus controles, pero de nuevo esa diferencia solo es estadísticamente significativa entre los corderos IS y CS. Por ello, es preciso señalar que el reducido número de animales que componen el grupo de animales resistentes (IR, n=4 y CR, n=4), pudo suponer una limitación para los análisis estadísticos en dichos grupos debido a la variabilidad individual detectada. Por tanto, teniendo en cuenta las limitaciones de este estudio, si el incremento de la expresión génica y proteica del TLR7 fuera realmente una respuesta común en los corderos IS e IR a la captación intestinal del prion, nuestros resultados concordarían con estudios previos en los que se describe que el transporte del prion a través de la barrera intestinal es independiente del genotipo (Jeffrey et al., 2006). No obstante, debido a la ausencia de diferencias estadísticamente significativas entre los corderos IR y CR, no podemos descartar que el mayor incremento génico y proteico del TLR7 en los corderos IS sea una respuesta específica de los corderos con genotipo susceptible y por tanto un factor determinante de la susceptibilidad.

Por otro lado, el inmunomarcaje del TLR7 en el citoplasma de células localizadas en la IFR, en los folículos linfoides y en el SNE supone la primera descripción inmunohistoquímica de este receptor en el íleon de la especie ovina y refleja un patrón similar al descrito previamente en el intestino delgado de ratones y humanos donde se ha detectado en células de la lámina propia (aunque no se ha determinado el tipo celular) (Huhta et al., 2016; Price et al., 2018) y en neuronas y células gliales del plexo mientérico y submucoso (Barajon et al., 2009). Sin embargo, el análisis semicuantitativo del inmunomarcaje del TLR7 no evidenció diferencias entre los cuatro grupos de corderos por lo que los resultados IHQ no permitieron determinar los componentes celulares del íleon responsables del origen del incremento detectado por qPCR y WB. Consecuentemente, solo podemos asociar el incremento de este receptor con células presentes en el íleon en las que previamente se haya descrito su expresión y que puedan estar implicadas en la infección con scrapie. Por este motivo, las principales candidatas son ciertos

tipos de CD; las CD CD11c^{+}, localizadas principalmente en la SED (Bonnardel et al., 2017) y/o las CDp, ubicadas en en la SED, en las IFR de las PP y en la lámina propia del intestino (Contractor et al., 2007). Ambos tipos de CD están ubicadas en posibles puntos de entrada de antígenos. Aunque la principal función de las CDp es la producción de IFN-I en las infecciones víricas (Kim et al., 2014), también se han detectado altos niveles de PrP^{Sc} asociados a estas células (Castro-Seoane et al., 2012). Por este motivo, y conociendo que las CDp ovinas expresan el *TLR7 (Pascale et al., 2008),* resulta probable que el incremento del *TLR7* esté asociado a estas células. De hecho, se ha comprobado que la estimulación vía oral de ratones con un ligando específico para el TLR7 induce el incremento de su expresión génica y proteica en las CDp a las pocas horas postinoculación (Bonnardel et al., 2017). Todo ello sugiere que el incremento del *TLR7* detectado en el íleon de corderos y ratones podría estar causado por la activación de las CDp. Además, la estimulación del TLR7 en las CDp induce la secreción de TNFα, también detectado en nuestro estudio, para activar e incrementar la cantidad de CD CD8α^{+} en las IFR de las PP e inducir la migración de las CD localizadas en las vellosidades hacia las IFR (Bonnardel et al., 2017) y hacia los linfonodos mesentéricos (Yrlid, Milling, et al., 2006).

El incremento en la expresión del *TLR5* detectada en el íleon de los ratones a las ocho horas post-inoculación vía oral también podría estar asociado con la activación de las CD de la lámina propia intestinal. Así, aunque también se ha descrito la expresión del *TLR5* en las células epiteliales intestinales (Chabot et al., 2008), las CD CD11c+de la lámina propia son las células que mayores niveles de *TLR5* expresan en el intestino de ratones, más incluso que las CD CD11c+ localizadas en las PP (Uematsu et al., 2006). Estas CD CD11c^{+} de la lámina propia constituyen el 10-15% de los leucocitos del intestino delgado de los ratones C57BL/6 y engloban una población heterogénea de cuatro subtipos de CD, de los cuales, solo el CD11c^{hi}CD11b^{hi} expresa ARNm del *TLR5* (Uematsu et al., 2008). De forma similar a lo descrito para el TLR7, la estimulación del TLR5 y consecuente maduración de estas CD induce su migración hacia los nódulos linfáticos mesentéricos (Lee & Iwasaki, 2007). De hecho, la respuesta a la estimulación del TLR5 y TLR7 vía oral en ratones es tan rápida que a las nueve horas postestimulación la activación, distribución y migración de las CD en el intestino ya se altera drásticamente (Bonnardel et al., 2017; Flores-Langarica et al., 2012). Además de la rapidez de la respuesta, cabe destacar que se trata de reacciones transitorias, lo que podría explicar por qué a las veinte horas postinoculación no se detectó ningún cambio en la expresión génica en el íleon de los ratones C57BL/6.

En el caso del íleon de las ovejas adultas inoculadas vía oral, a diferencia de los corderos, no se detectó ningún cambio en la expresión génica de los *TLR* entre las ovejas que recibieron el inóculo con scrapie y las control. La ausencia de respuesta inmune innata, *a priori* mediada por los TLR, podría tener diferentes causas: la primera y más sencilla, es que el tiempo de toma de muestras postinoculación no fuera el idóneo para detectar cambios de expresión en los genes analizados, bien porque fuera un momento demasiado temprano o porque fuera demasiado tardío. De hecho, como reflejan nuestros resultados en los ratones C57BL/6, el número de horas postinoculación es clave para detectar cambios, ya que a las ocho horas postinoculación sí que se detectaron cambios en la expresión del *TLR5, TLR7* y *TNF-α,* pero no a las veinte horas postinoculación. De este modo, aunque el tiempo de toma de muestras se determinó en

función de los tiempos de tránsito digestivo en cada especie animal y cada estadio ontogénico, estimación que si fue útil en corderos, no podemos asegurar que fuese el correcto en el caso de las ovejas. Otro posible factor responsable de la ausencia de cambios en la expresión génica en el íleon de las ovejas podría ser la cantidad de tejido linfoide. Por este motivo, si los cambios en la expresión génica dependen de las células localizadas en el tejido linfoide, el hecho de que las ovejas adultas tengan menos cantidad de tejido linfoide en el íleon podría explicar el fallo en la detección de cambios de expresión en ese tejido. Por otro lado, también existe la posibilidad de que la dosis del inóculo administrado a las ovejas, aunque se ha descrito como infectiva en estudios previos (Foster, Parnham, Chong, et al., 2001; O'Rourke et al., 1997), no fuera suficiente para causar la infección del los animales adultos incluidos en nuestro estudio. Este último supuesto podría ser determinante en el caso de las ovejas con genotipo resistente, pero no tanto en las ovejas con genotipo susceptible ya que se han descrito tasas de infección superiores al 80% en ovejas adultas con genotipo ARQ/ARQ o VRQ/ARQ (Foster, Parnham, Chong, et al., 2001; O'Rourke et al., 1997). Tampoco se puede descartar que el proceso de digestión del inóculo o la ruta de captación del prion sean diferentes entre el cordero neonato y la oveja adulta. Así, las características fisiológicas de los corderos neonatos, como la presencia de la gotera esofágica, la menor capacidad proteolítica en sus procesos de digestión, o la mayor permeabilidad intestinal (Khan & Ahmad, 1997; Westrom et al., 2020), podrían ser factores que facilitaran la captación del inóculo y, como consecuencia, la infección. Por último, las diferencias entre la expresión génica de los corderos y las ovejas podrían también deberse a la inmunosenescencia, es decir, a los cambios que se producen en las células inmunitarias a causa del envejecimiento. Así, aunque por el momento se desconocen los mecanismos por los que la edad altera la función de los TLR, se han descrito cambios asociados a edades avanzadas como niveles más bajos de expresión génica de los TLR en las células inmunitarias, defectos en la fagocitosis y migración de dichas células tras la activación de sus TLR o una menor capacidad para producir citoquinas en respuesta a la estimulación de los TLR (Panda et al., 2010; Shaw et al., 2011).

En conclusión, nuestros resultados revelan por primera vez la sobreexpresión del *TLR5* y *TLR7* como respuesta a la entrada del prion a través de la barrera intestinal a nivel del íleon y sugieren que el estadio ontogénico y el periodo postinoculación son decisivos para detectar la participación de dichos receptores en la respuesta frente al agente. Teniendo en cuenta que el bloqueo de la migración de las CD (CD11c+) hacía el tejido linfoide reduce la susceptibilidad a la infección vía oral con scrapie (Bradford et al., 2017; Raymond et al., 2007) y que la estimulación del TLR5 y TLR7 en el intestino está asociada con el desencadenamiento de la migración de las CD (entre ellas las CD11c+), es posible que ambos receptores jueguen un papel importante en la diseminación del prion desde el punto de entrada en la infección vía oral con scrapie.

3.1. Las células dendríticas y su posible papel en la tolerancia inmunológica frente al prion.

Las CD cumplen una función importantísima en la activación de la respuesta inmunitaria innata y son consideradas incluso mejores CPA que los macrófagos. Esta característica se debe a que son capaces de retener durante largos periodos de tiempo los antígenos fagocitados y degradarlos

más lentamente, lo que les permite presentar sus péptidos asociados al CMH-II con mayor eficacia (Delamarre et al., 2005). Sin embargo, debido a su capacidad fagocítica, en ciertas ocasiones pueden acabar captando moléculas de origen endógeno que no deben exponer en su superficie para evitar problemas de autoinmunidad. Para impedirlo, las CD tienen mecanismos que controlan la maduración de los fagosomas y que determinan si el contenido acaba siendo digerido en péptidos más pequeños para presentarlos a través de su CMH-II o simplemente se degradará por completo en los lisosomas (Blander & Medzhitov, 2006a). En este proceso son clave los TLR ya que se ha comprobado que la señal que regula el tipo de maduración de los fagosomas procede de señales internas de su propio contenido. De este modo, si el material fagocitado contiene ligandos capaces de estimular a los TLR presentes en el fagosoma, acabará siendo expuesto sobre la membrana de las CD asociado al MHC-II, pero si no tiene la capacidad para estimular a los TLR, el contenido simplemente se degradará (Blander & Medzhitov, 2004, 2006b). De este modo, los TLR además de estar relacionados con la activación de las CD y su maduración, también permiten a las CD determinar qué antígenos deben exponer en su superficie para generar una respuesta inmune específica.

Esta capacidad de los TLR sugiere una posible participación de los mismos en el procesamiento de la PrP^{Sc} una vez es fagocitada por parte de las CD. Por el momento, a pesar de que las CD son capaces de internalizar y degradar (al menos en parte) la PrP^{Sc} (Luhr et al., 2004; Luhr et al., 2002; Rybner-Barnier et al., 2006), no se ha detectado que presenten de forma natural péptidos de PrP^{Sc} asociados a su CMH-II (Zabel & Avery, 2015). Esto podría tener dos posibles causas: o bien el proceso de degradación enzimática de la PrP^{Sc} en los fagolisosomas es ineficaz (debido a la resistencia intrínseca de dicha proteína a la degradación enzimática) impidiendo que se generen péptidos para su presentación o, de acuerdo con lo explicado anteriormente, la PrP^{Sc} podría no estimular los TLR de los fagolisosomas al ser una proteína de origen endógeno. Si la segunda hipótesis fuera correcta, los TLR podrían estar detrás de la tolerancia de las CD a la PrP^{Sc} y, en tal caso, la estrategia terapéutica tendría que tener por objetivo lograr eludir esa tolerancia. Se ha comprobado que la administración vía parenteral de CD cargadas artificialmente con péptidos de PrP inmunogénicos incrementa los niveles de IFNγ, IL-4, induce la síntesis de anticuerpos, disminuye el ritmo de linfoinvasión y aumenta el periodo de supervivencia en ratones infectados con scrapie (Bachy et al., 2010). Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de desentrañar el papel que juegan exactamente los TLR en la tolerancia de las CD frente al prion con el fin de desarrollar estrategias terapéuticas en este sentido.

4. El modelo murino en el estudio de la respuesta inmunitaria de los TLR frente a la infección con scrapie.

El uso de modelos murinos en la investigación científica está ampliamente extendido ya que permite estudiar un número amplio de individuos, simplificar el manejo y reducir variables tanto ambientales como genéticas gracias a su cría en condiciones controladas. Además, hoy en día existen numerosas líneas transgénicas diseñadas específicamente para el estudio de ciertas enfermedades, como por ejemplo, las enfermedades priónicas y otras enfermedades neurodegenerativas (Groschup & Buschmann, 2008). Estas líneas transgénicas desarrollan las

características patológicas clave de dichas enfermedades y además permiten probar tratamientos para analizar su efectividad. Sin embargo, la extrapolación de los resultados obtenidos en estos modelos murinos directamente a los humanos u a otras especies animales puede no ajustarse a la realidad o incluso resultar errónea. Si bien es cierto que entre las especies murina, ovina y humana hay grandes similitudes al tratarse de mamíferos, todas ellas difieren en aspectos como su anatomía, su fisiología y su genética, especialmente en el caso de los animales transgénicos.

Al comparar nuestros resultados en la especie ovina con los de la especie murina se pone en evidencia la existencia de ciertas limitaciones en el uso de los modelos murinos para el estudio de la neuroinflamación en las enfermedades priónicas, subrayando la importancia del estudio de la enfermedad natural en la especie ovina como modelo más extrapolable a la neuropatología humana. Como hemos mencionado anteriormente, la detección de depósitos de PrP^{Sc}, una gliosis reactiva y signos de degeneración espongiforme en el diencéfalo de los ratones tg338 infectados con scrapie, avalan la validez del modelo para desarrollar las principales lesiones descritas en rumiantes y humanos infectados con algún tipo de enfermedad priónica. Sin embargo, los resultados sobre los cambios en la expresión génica del los *TLR* muestran diferencias claras en la respuesta inmunitaria a nivel génico entre las ovejas y los ratones tg338. Por el contrario, los ratones C57BL/6 inoculados vía oral con scrapie, sí que reprodujeron las alteraciones génicas causadas por la inoculación vía oral de los corderos al analizar el íleon. Esta discrepancia plantea la duda sobre si el estudio de los *TLR* en el SNC en una línea murina *wyldtype* sería más adecuado pudiendo reproducir resultados más similares a los obtenidos en las ovejas infectadas con scrapie. Sin embargo, hay estudios previos que tampoco han detectado incrementada la expresión del *TLR4* en el tálamo de ratones C57BL/6 (Carroll, Race, Williams, & Chesebro, 2018) o en el cerebelo o el hipocampo de ratones CD-1 inoculados vía intracerebral con scrapie, pero sí describen el incremento de los *TLR1, 2,* y *7* al igual que en los ratones tg338. El hallazgo de la participación del TLR4 en la patogenia del scrapie natural ovino concuerda con los resultados de otros dos estudios previos, uno en el SNC de pacientes con ECJe (Llorens et al., 2014) y otro en la sangre de corderos infectados con scrapie (Meling et al., 2018) en los que sí se ha descrito el incremento del *TLR4*. De acuerdo con nuestras observaciones, Frederiksen y colaboradores (Frederiksen et al., 2019) también ponen de manifiesto el hallazgo de diferencias entre las alteraciones detectadas en los TLR en modelos murinos para el estudio del AD y los casos humanos de AD. Y es que no hay que olvidar que el nivel de expresión y el tipo de TLR expresados por las diferentes células varía entre especies (Rehli, 2002; Turin & Riva, 2008), por lo que la especie murina podría no ser un modelo apropiado para el estudio de la respuesta inmunitaria innata en las enfermedades priónicas humanas y de otros grandes mamíferos. Por tanto, todos estos resultados sugieren que la respuesta de los PRR en la especie murina, y en particular los TLR, difere de la respuesta neuroinflamatoria detectada en la especie ovina y humana y subrayan la importancia del estudio de la enfermedad priónica natural en la especie ovina como modelo más extrapolable a la neuropatología humana.

Por otro lado, habiéndose descrito diferencias en los signos clínicos, en la cantidad de PrP^{Sc} y en la neuropatología de ratones inoculados vía periférica (intraperitoneal) o vía intracerebral con

scrapie (Langevin et al., 2011), podría ser discutible el efecto de la vía de inoculación elegida en nuestro caso para el estudio de la expresión de los *TLR* en la especie murina. Asimismo, podría plantearse que las diferencias observadas entre la especie murina y ovina son consecuencia de la cepa priónica más prevalente en el SNC (Barrio et al., 2020). Sin embargo, en contraposición a estas hipótesis, estudios recientes señalan que el perfil génico de la respuesta neuroinflamatoria es independiente de la cepa de scrapie (Carroll et al., 2016; Makarava, Chang, Molesworth, et al., 2020). Es decir, el tipo de cepa influye en la secuencia y en la magnitud en la que los genes se perturban en la respuesta neuroinflamatoria pero no en qué genes se alteran debido, probablemente, a que la respuesta neuroinflamatoria es consecuencia del daño neuronal inducido de forma directa o indirecta por la PrP^{Sc}. Por esta razón cabe esperar que la inoculación vía periférica y/o con diferentes cepas de scrapie genere una respuesta neuroinflamatoria similar a la observada en nuestro estudio, demostrando que no son esos factores sino la especie animal la clave de las diferencias detectadas entre el modelo murino y ovino.

CONCLUSIONES

1. Animales infectados de forma natural con scrapie muestran, por primera vez, cambios en la expresión génica de los *TLR* en el SNC que se correlacionan con el grado lesional (espongiosis, depósitos de PrP^{Sc} y gliosis) en cada una de las regiones del SNC estudiadas, lo que coincide a su vez con la mencionada progresión caudo-rostral de la neuropatología priónica. Estos resultados sugieren por tanto la participación de este tipo de receptores en la neuropatología de la enfermedad del scrapie.

2. El aumento en la expresión génica y proteica del TLR4 en todas las regiones del SNC analizadas de las ovejas infectadas con scrapie, independientemente de la neuropatología y/o la fase clínica, indica un papel relevante de este receptor en la respuesta neuroinflamatoria frente al scrapie.

3. La descripción de células microgliales en bastón por primera vez en el hipocampo de ovejas infectadas con scrapie sugiere la existencia de una respuesta glial diferente frente al prion en esta región neuroanatómica.

4. El hallazgo en el hipocampo de las ovejas infectadas con scrapie de una neuropatología leve en comparación con la gravedad de las lesiones en las áreas circundantes, una expresión menor del *TLR1, TLR2* y *MyD88,* la ausencia de alteraciones en *CD36* y las citoquinas y la presencia de una morfología microglial única, sugieren un patrón de respuesta frente al prion contrario al resto de regiones neuroanatómicas analizadas y sugieren un potencial entorno neuroprotector en esta región.

5. El modelo murino tg338, reproduce los signos neuropatológicos comunes de la infección por priones sin embargo, las discrepancias con respecto al modelo natural relativas a la expresión de los *TLRs* en el SNC evidencian la escasa idoneidad del modelo para reproducir diferentes aspectos de la respuesta inmunitaria en la infección natural por scrapie.

6. Las diferencias en el tejido linfoide del íleon, y en particular de las CDF, principal punto de entrada del prion, observadas en neonatos respecto a los adultos, podría ser determinante para explicar las diferencias del riesgo de infección vía oral de los dos estadios ontogénicos: corderos vs ovejas adultas.

7. El incremento en la expresión del *TLR4* en el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie, independientemente de su fase clínica, evidencia la participación de este receptor en la patogenia periférica del scrapie. Además, el inmunomarcaje del TLR4 revela por primera vez en esta especie su expresión en células localizadas en el interior de los folículos linfoides, compatibles morfológicamente con macrófagos, y en el plexo submucoso y mientérico.

8. El aumento en la expresión génica y proteica del TLR7 en el íleon de corderos inoculados vía oral con scrapie, pero no en adultos, indica que este receptor podría intervenir en la captación del prion a nivel intestinal en esta fase ontogénica y estar

asociado a su mayor susceptibilidad. Además, su aumento parece influenciado por el genotipo ya que los corderos corderos con genotipo susceptible muestran mayores cambios de expresión.

9. El incremento del *TLR7* y *TNFα* en el íleon de los modelos murino (C57BL/6) y ovino tras la inoculación oral con scrapie sugiere que la respuesta inmune e inflamatoria ante el prion a nivel de la barrera intestinal es similar en ambas especies.

RESUMEN

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) o enfermedades priónicas son un grupo de trastornos neurodegenerativos lentos y progresivos, que afecta a los animales y al hombre, caracterizados por la degeneración espongiforme, una gliosis reactiva y la acumulación de la isoforma patológica (PrP^{Sc}) de la proteína prion celular (PrP^{C}) en el sistema nervioso central (SNC). El scrapie es la EET que afecta a ovejas, cabras y muflones y, aunque es la EET más común y estudiada, todavía se desconocen numerosos aspectos relacionados con la patogenia de esta enfermedad. Aunque originalmente se creía que el sistema inmunológico no reaccionaba frente al prion, debido a un mecanismo de tolerancia inmunológica al tratarse de una proteína de origen endógeno, en la actualidad está ampliamente demostrada la activación de la respuesta inmunológica innata, un factor clave en la neuroinflamación y la neurodegeneración. Conocer qué receptores del sistema inmune se activan y por medio de qué vías de señalización actúan es fundamental para llegar a comprender la patogenia de estas enfermedades y desarrollar en un futuro estrategias terapéuticas.

Con este escenario y utilizando el scrapie ovino como modelo animal de EET, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es estudiar la participación de los receptores tipo Toll (TLR), unos receptores del sistema inmune innato involucrados en la patogenia de otras enfermedades neurodegenerativas humanas, en la respuesta inmune en el SNC e íleon en la especie ovina y murina mediante el análisis de su expresión génica (qPCR) y proteica (inmunohistoquímica y/o western blot).

En el primer estudio se realiza una evaluación detallada de las principales características neuropatológicas del scrapie utilizando técnicas histológicas e IHQ en la médula oblongada, tálamo, hipocampo y corteza frontal de ovejas infectadas de forma natural con scrapie y en el diencéfalo de ratones tg338 inoculados vía intracerebral con scrapie. Paralelamente se analiza la expresión génica de los diez tipos de *TLR* ovinos y nueve murinos, así como otros genes relacionados con sus mecanismos de señalización, para correlacionar los cambios de expresión génicaa con las características neuropatológicas detectadas. Los resultados del estudio no solo confirman la participación de los *TLR* en la neuropatología del scrapie ovino y murino, sino también que el número de *TLR* sobreexpreados está relacionado con la gravedad de las lesiones neuropatológicas de la región del SNC analizada. Además, muestran que la expresión del *TLR4* es la que más se incrementa en las ovejas infectadas respecto a las control en las cuatro regiones del SNC analizadas. A su vez, dicho incremento se traduce en un aumento en los niveles proteicos del TLR4 analizados por WB. Por otro lado, los hallazgos anatomopatológicos y génicos en el hipocampo de las ovejas con scrapie evidencian una neuropatología diferente respecto al resto de regiones analizadas, por lo que apoyan estudios previos que indican que el hipocampo es una región inmunoprivilegiada y menos vulnerable a la neurodegeneración.

En el segundo estudio, se analiza la respuesta de los *TLR* y otros genes relacionados con la respuesta inmunitaria mediante qPCR en el íleon, el principal punto de entrada del prion en la infección vía oral en condiciones naturales, en dos fases diferentes de la infección: la fase en el que el prion atraviesa la barrera intestinal y una fase más avanzada en la que infección ya se ha instaurado en el tejido linfoide ileal y ha alcanzado el sistema nervioso entérico (SNE). Para el evaluar la primera fase, se analiza el íleon de corderos neonatos, ovejas adultas y ratones C57BL/6 a las pocas horas postinoculación vía oral con scrapie. Además, a fin de comprobar si el

genotipo influye en la expresión de los *TLR* como respuesta a la captación del prion vía digestiva, el estudio se llevó a cabo con corderos y ovejas con diferente susceptibilidad al scrapie clásico según su genotipo para el gen *PRNP.* Para el estudio de los *TLR* en la fase más desarrollada de la infección con scrapie, se analiza el íleon de ovejas infectadas de forma natural con scrapie en dos estadios clínicos, uno más incipiente y otro más avanzado. Asimismo, se evalua mediante técnicas IHQ la cantidad y distribución de los depósitos de PrP^{Sc}, macrófagos y CDF en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural y de los corderos y ovejas adultas inoculados vía oral. Solo se detectaron depósitos de PrP^{Sc} y cambios en la cantidad de macrófagos y CDF en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural respecto a sus controles. Además, se describe por primera vez el incremento del la expresión génica de dos *TLR* en el íleon como consecuencia de la infección con scrapie; el *TLR4 ,* en las ovejas infectadas de forma natural, y el *TLR7,* en los corderos con genotipo susceptible y los ratones C57BL/6 inoculados vía oral. También se demuestra la expresión del TLR4 y TLR7 mediante técnicas IHQ en el íleon de las ovejas y de los corderos respectivamente aunque no se detectan cambios cuantitativos en el inmunomarcaje entre los grupos infectados y control. No obstante, en el caso del íleon de los corderos, el incremento en la expresión génica del *TLR7* sí llega a correlacionarse con un aumento en los niveles proteicos analizados por WB. Por el contrario, en el íleon de las ovejas adultas inoculadas vía oral no se detectan cambios en la expresión génica de los *TLR* asociados a la infección con scrapie.

Como conclusión, los resultados de estos estudios responden al objetivo principal planteado en esta tesis doctoral, demostrando la participación de los TLR en la patogenia del scrapie tanto periférica como central. Además, demuestran que la especie ovina es un buen modelo animal para el estudio de las enfermedades priónicas

ABSTRACT

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases are a group of slow and progressive neurodegenerative disorders, that affect animals and humans, characterised by spongiform degeneration, reactive gliosis and accumulation of the pathological isoform (PrP^{Sc}) of the cellular prion protein (PrP^{C}) in the central nervous system (CNS). Scrapie is the TSE that affects sheep, goats and mouflon and, although it is the most common and studied TSE, many aspects related to the pathogenesis of this disease are still unknown. Although it was originally believed that the immune system did not react to the prion due to an immune tolerance mechanism as PrP^{C} is a protein of endogenous origin, the activation of the innate immune response, a key factor in neuroinflammation and neurodegeneration, is now widely demonstrated. Knowing which immune system receptors are activated and through which signalling pathways they act is essential to understand the pathogenesis of these diseases and to develop therapeutic strategies in the future.

Against this background and using sheep scrapie as an animal model of TSE, the main objective of this thesis is to study the involvement of Toll-like receptors (TLRs), a type of innate immune system receptors involved in the pathogenesis of other human neurodegenerative diseases, in the immune response in the CNS and ileum of sheep and mice by analysing their gene (qPCR) and protein (immunohistochemistry and/or western blot) expression.

In the first study, a detailed evaluation of the main neuropathological features of scrapie is carried out using histological and immunohistochemical (IHC) techniques in the medulla oblongata, thalamus, hippocampus and frontal cortex of sheep naturally infected with scrapie and in the diencephalon of tg338 mice intracerebrally inoculated with scrapie. In parallel, the gene expression of the ten types of ovine and nine murine TLRs, as well as other genes related to their signalling mechanisms, were analysed to correlate the changes in gene expression with the detected neuropathological characteristics. The results of this study not only confirm the involvement of TLRs in the neuropathology of ovine and murine scrapie, but also prove that the number of overexpressed TLRs is related to the severity of neuropathological lesions in the analysed CNS region. Furthermore, the results show that TLR4 expression is the most overexpressed in infected sheep compared to control sheep in the four analysed CNS regions. In turn, this genetic overexpression translates into an increase in the protein levels of TLR4 analysed by WB. On the other hand, the anatomopathological and genetic findings in the hippocampus of sheep with scrapie show a different neuropathology compared to the other analysed regions, supporting previous studies that indicate that the hippocampus is an immunoprivileged region and less vulnerable to neurodegeneration.

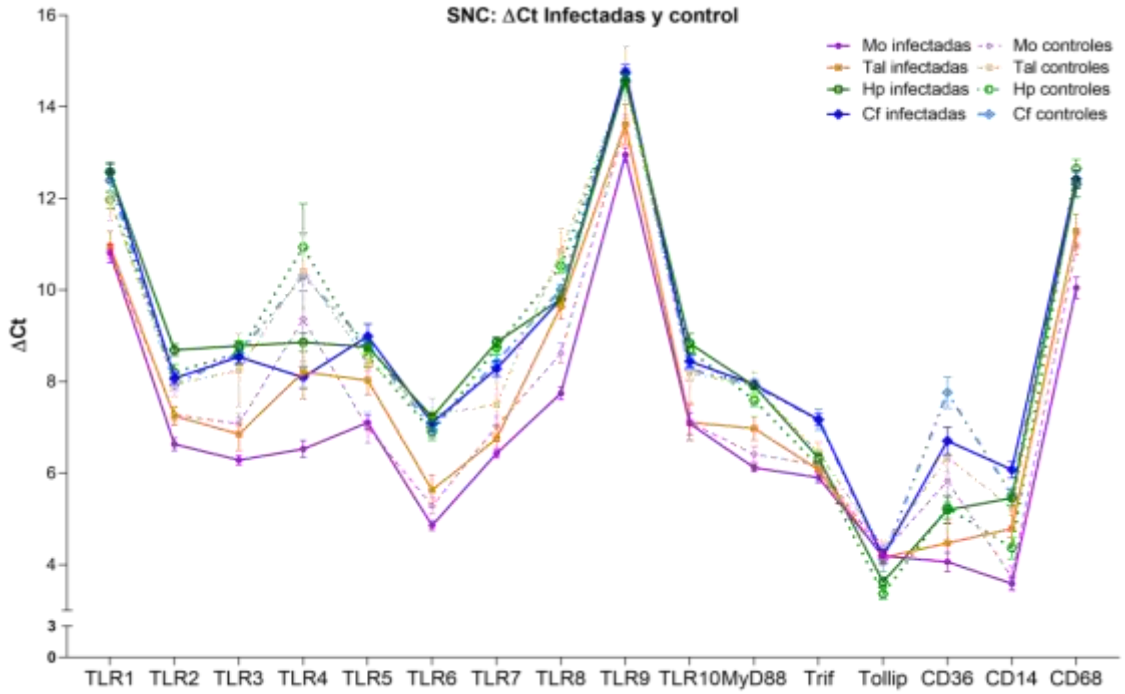
In the second study, the response of TLRs and other genes related to the immune response is analysed by qPCR in the ileum, the main entry point of prion infection via the oral route under natural conditions, in two different phases of infection: the phase in which the prion crosses the intestinal barrier and a more advanced phase in which the infection has already established in the ileal lymphoid tissue and has reached the enteric nervous system. To evaluate the first phase, the ileum of neonatal lambs, adult sheep and C57BL/6 mice were analysed after several hours after oral inoculation of these animals with scrapie. In addition, in order to test whether the genotype influences TLR expression in response to prion uptake via the digestive tract, the study was carried out with lambs and sheep with different susceptibility to classical scrapie

according to their genotype for the *PRNP* gene. For the study of TLRs in the most developed stage of scrapie infection, the ileum of sheep naturally infected with scrapie in two clinical stages, one more incipient and the other more advanced, is analysed. In addition, the amount and distribution of PrP^{Sc}, macrophages and follicular dendritic cells (FDC) deposits in the ileum of naturally infected sheep and orally inoculated lambs and sheep were assessed by IHC techniques. PrP^{Sc} was detected only in the ileum of naturally infected sheep and changes in the number of macrophages and FDCs were only observed in the ileum of sheep naturally infected with scrapie compared to their controls. In addition, we describe for the first time the increased gene expression of two TLRs in the ileum as a consequence of scrapie infection; *TLR4,* in naturally infected sheep, and *TLR7,* in lambs with susceptible genotype and orally inoculated C57BL/6 mice. TLR4 and TLR7 expression is also demonstrated by IHC techniques in the ileum of sheep and lambs respectively although no quantitative changes between infected and control groups are detected. However, in the case of the lambs ileum, the increase in TLR7 gene expression does correlate with an increase in protein levels analysed by WB. In contrast, no changes in TLR gene expression associated with scrapie infection were detected in the ileum of adult sheep orally inoculated.

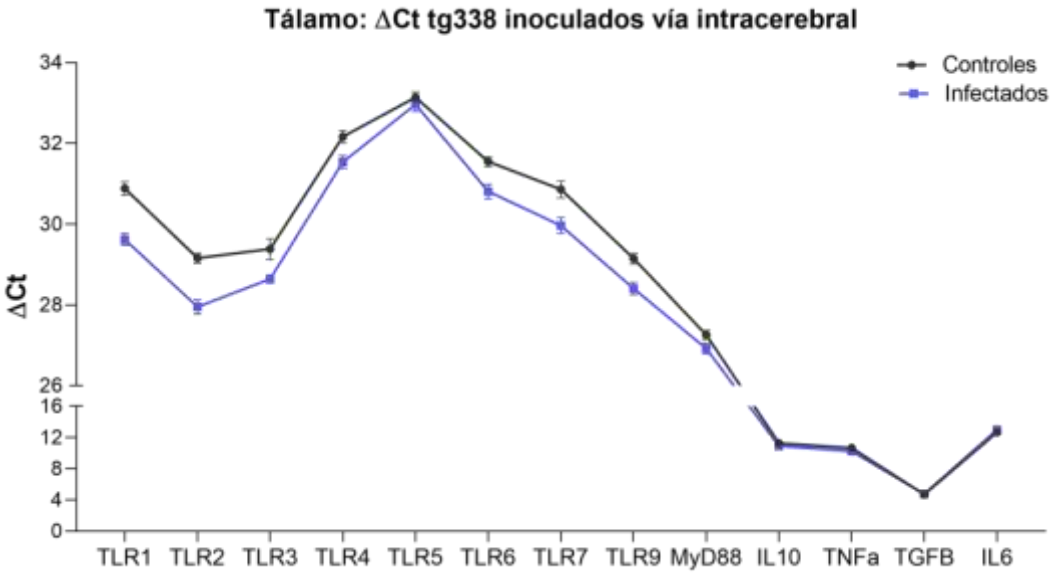
In conclusion, the results of these studies respond to the main objective of this thesis, demonstrating the involvement of TLRs in the pathogenesis of both peripheral and central scrapie. Furthermore, they demonstrate that the ovine species is a good animal model for the study of prion diseases.

ANEXOS

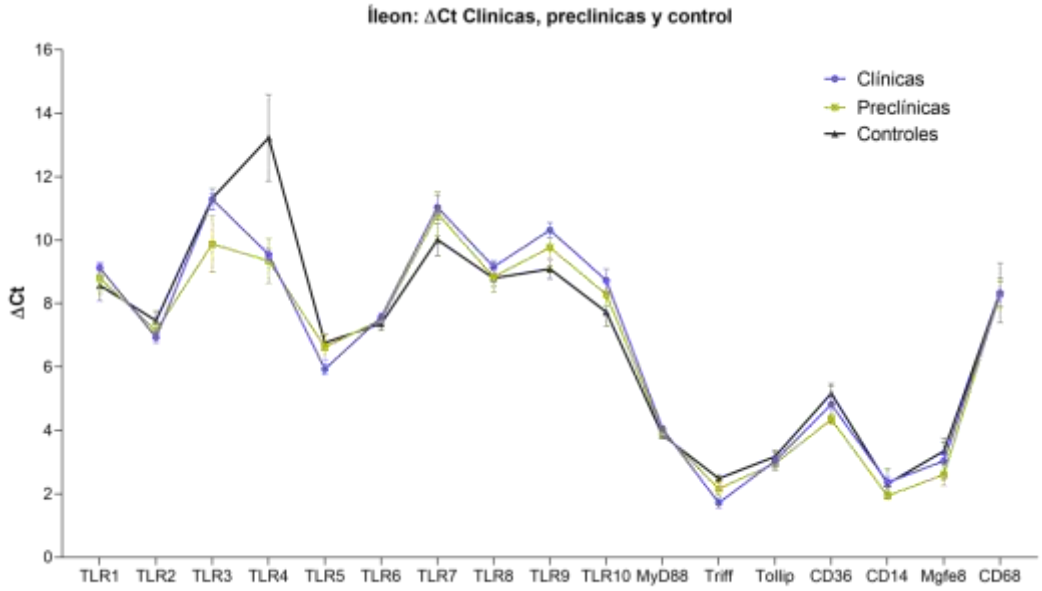
<u>Anexo 1:</u> Valores ΔCt medios de los genes analizados en el SNC de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control.



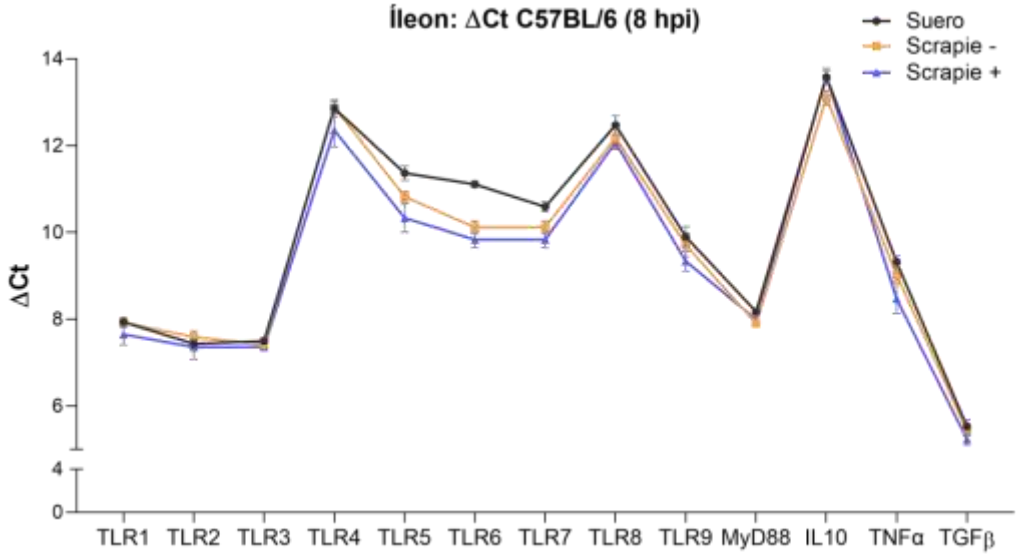
<u>Anexo 2:</u> Valores ΔCt medios de los genes analizados en el tálamo de los ratones tg338 inoculados vía intracerebral con scrapie y control.

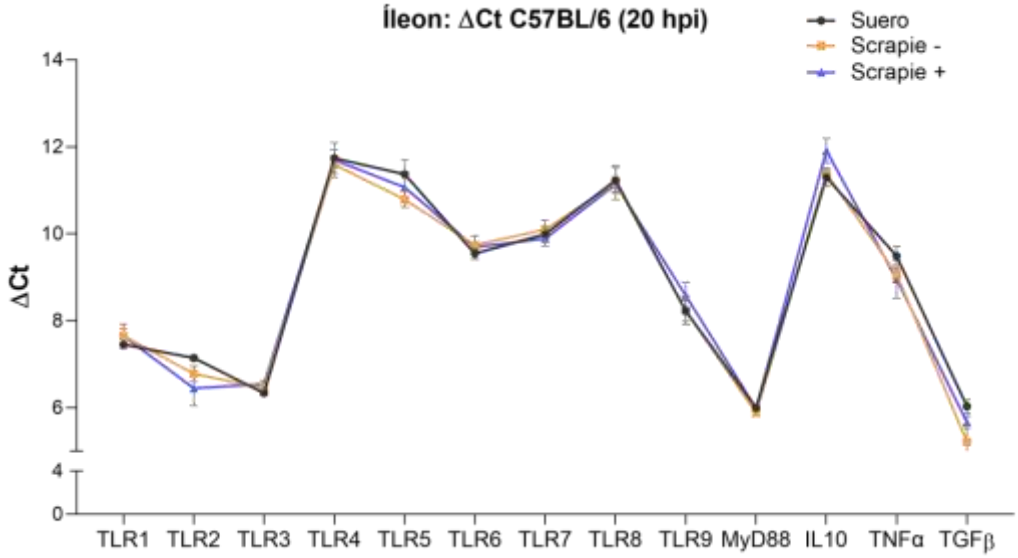


<u>Anexo 3:</u> Valores ΔCt medios de los genes analizados en el íleon de las ovejas infectadas de forma natural con scrapie y control.

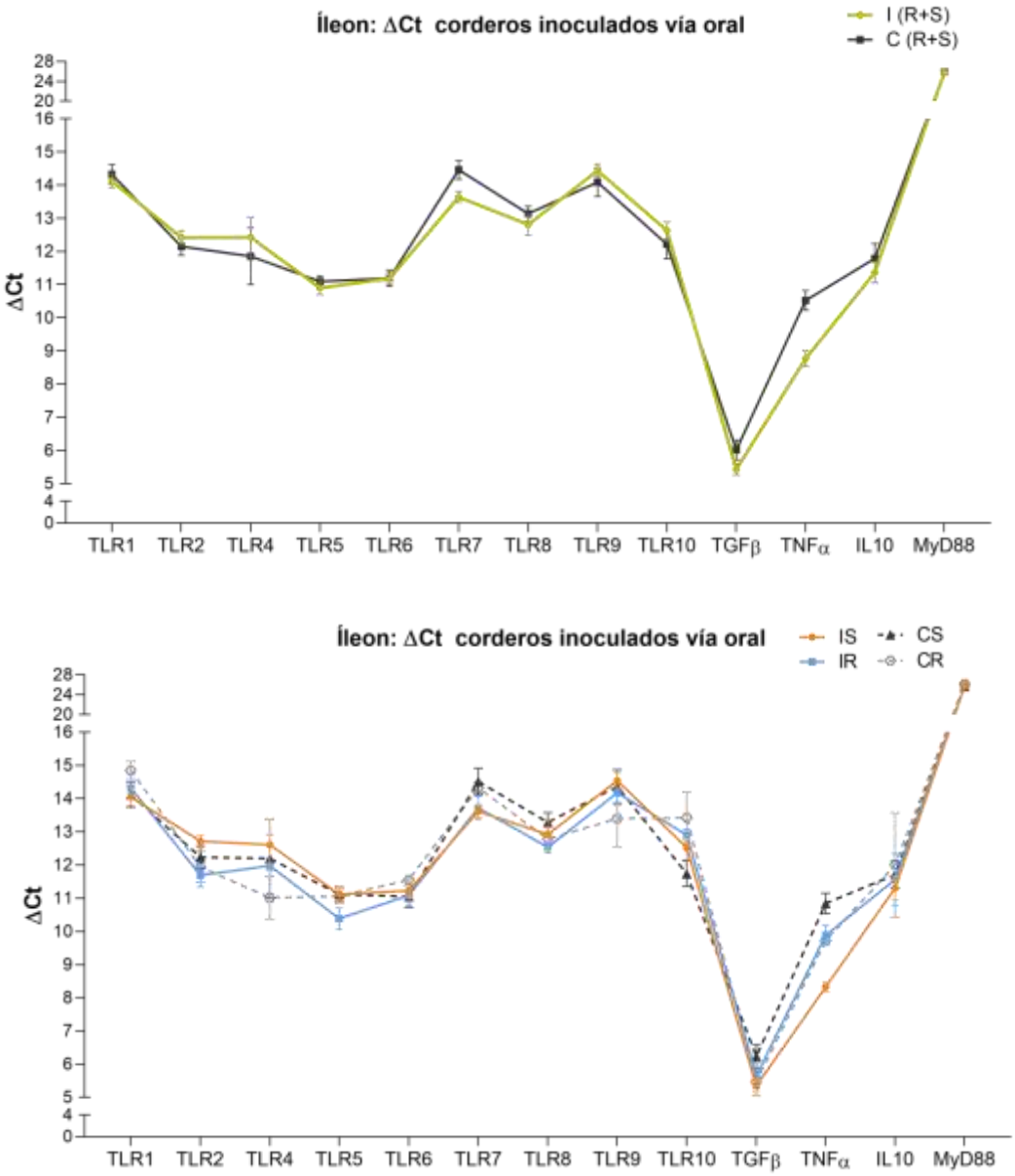


<u>Anexo 4:</u> Valores ΔCt medios de los genes analizados en el íleon de los ratones C57BL/6 inoculados vía oral.

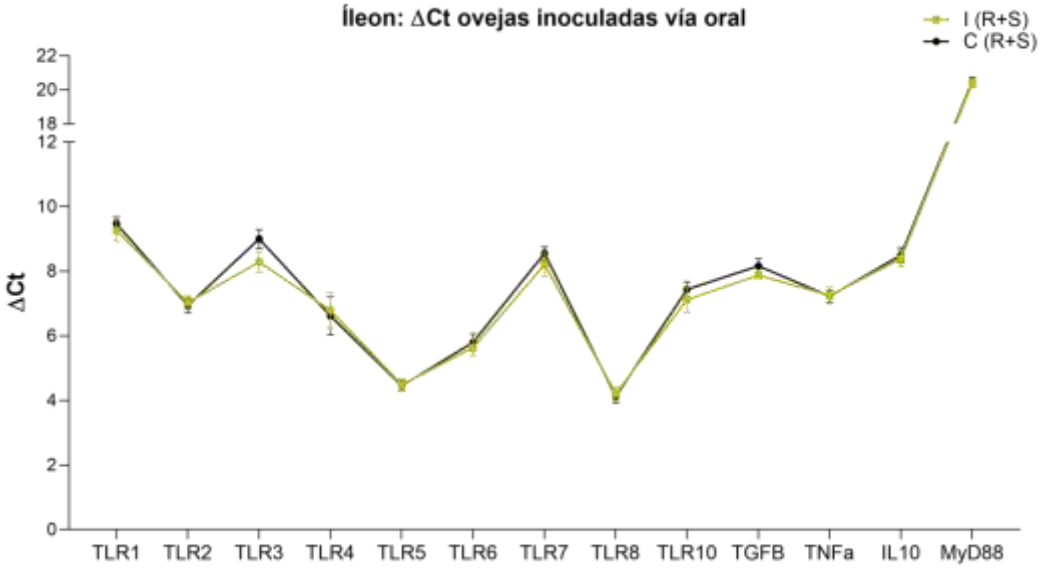


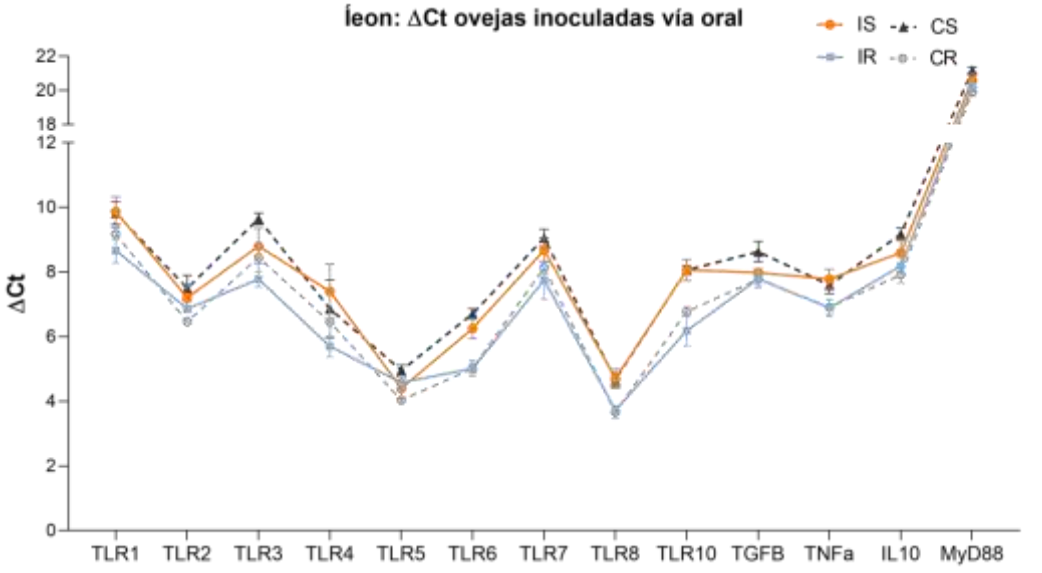


<u>Anexo 5:</u> Valores ΔCt medios de los genes analizados en el íleon de los corderos inoculados vía oral con scrapie y control.



<u>Anexo 6:</u> Valores ΔCt medios de los genes analizados en el íleon de las ovejas adultas inoculadas vía oral con scrapie y control.





REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat Rev Immunol*, *10*(2), 131-144. https://doi.org/10.1038/nri2707

Achek, A., Yesudhas, D., & Choi, S. (2016). Toll-like receptors: promising therapeutic targets for inflammatory diseases. *Arch Pharm Res*, *39*(8), 1032-1049. https://doi.org/10.1007/s12272-016-0806-9

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 (Basel)*, *11*(3). https://doi.org/10.3390/ani11030691

Aguilar-Calvo, P., Xiao, X., Bett, C., Erana, H., Soldau, K., Castilla, J., Nilsson, K. P., Surewicz, W. K., & Sigurdson, C. J. (2017). Post-translational modifications in PrP expand the conformational diversity of prions in vivo. *Sci Rep*, *7*, 43295. https://doi.org/10.1038/srep43295

Aguzzi, A., Heppner, F. L., Westner, I. M., & Glatzel, M. (2007). 42 – Prion Diseases. *Neurobiology of Disease*, 473-483.

Aguzzi, A., Kranich, J., & Krautler, N. J. (2014). Follicular dendritic cells: origin, phenotype, and function in health and disease. *Trends Immunol*, *35*(3), 105-113. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.11.001

Aguzzi, A., & Liu, Y. (2017). A role for astroglia in prion diseases. *J Exp Med*, *214*(12), 3477-3479. https://doi.org/10.1084/jem.20172045

Aguzzi, A., & Zhu, C. (2017). Microglia in prion diseases. *J Clin Invest*, *127*(9), 3230-3239. https://doi.org/10.1172/JCI90605

Akesson, C. P., Mc, L. P. C., Espenes, A., & Aleksandersen, M. (2008). Phenotypic characterisation of intestinal dendritic cells in sheep. *Dev Comp Immunol*, *32*(7), 837-849. https://doi.org/10.1016/j.dci.2007.12.004

Akira, S., & Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*, *4*(7), 499-511. https://doi.org/10.1038/nri1391

Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783-801. https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015

Ali, F., Hossain, M. S., Sejimo, S., & Akashi, K. (2019). Plasmalogens Inhibit Endocytosis of Toll-like Receptor 4 to Attenuate the Inflammatory Signal in Microglial Cells. *Mol Neurobiol*, *56*(5), 3404-3419. https://doi.org/10.1007/s12035-018-1307-2

Alibhai, J., Blanco, R. A., Barria, M. A., Piccardo, P., Caughey, B., Perry, V. H., Freeman, T. C., & Manson, J. C. (2016). Distribution of Misfolded Prion Protein Seeding Activity Alone Does Not Predict Regions of Neurodegeneration. *PLoS Biol*, *14*(11), e1002579. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002579

Allaire, J. M., Crowley, S. M., Law, H. T., Chang, S. Y., Ko, H. J., & Vallance, B. A. (2018). The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol*, *39*(9), 677-696. https://doi.org/10.1016/j.it.2018.04.002

Allen, C. D., & Cyster, J. G. (2008). Follicular dendritic cell networks of primary follicles and germinal centers: phenotype and function. *Semin Immunol*, *20*(1), 14-25. https://doi.org/10.1016/j.smim.2007.12.001

Alper, T., Cramp, W. A., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1967). Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature*, *214*(5090), 764-766. https://doi.org/10.1038/214764a0

Alper, T., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1966). The exceptionally small size of the scrapie agent. *Biochem Biophys Res Commun*, *22*(3), 278-284. https://doi.org/10.1016/0006-291x(66)90478-5

Alper, T., Haig, D. A., & Clarke, M. C. (1978). The scrapie agent: evidence against its dependence for replication on intrinsic nucleic acid. *J Gen Virol*, *41*(3), 503-516. https://doi.org/10.1099/0022-1317-41-3-503

Anderson, K. V., Jurgens, G., & Nusslein-Volhard, C. (1985). Establishment of dorsal-ventral polarity in the Drosophila embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell*, *42*(3), 779-789. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90274-0

Andreoletti, O., Berthon, P., Marc, D., Sarradin, P., Grosclaude, J., van Keulen, L., Schelcher, F., Elsen, J. M., & Lantier, F. (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*(Pt 12), 3115-3126. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-12-3115

Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., Berthon, P., Eychenne, F., Lafond-Benestad, S., Elsen, J. M., & Schelcher, F. (2002). PrP(Sc) accumulation in placentas of ewes exposed to natural scrapie: influence of foetal PrP genotype and effect on ewe-to-lamb transmission. *J Gen Virol*, *83*(Pt 10), 2607-2616. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-10-2607

Andreoletti, O., Morel, N., Lacroux, C., Rouillon, V., Barc, C., Tabouret, G., Sarradin, P., Berthon, P., Bernardet, P., Mathey, J., Lugan, S., Costes, P., Corbiere, F., Espinosa, J. C., Torres, J. M., Grassi, J., Schelcher, F., & Lantier, F. (2006). Bovine spongiform encephalopathy agent in spleen from an ARR/ARR orally exposed sheep. *J Gen Virol*, *87*(Pt 4), 1043-1046. https://doi.org/10.1099/vir.0.81318-0

Andreoletti, O., Orge, L., Benestad, S. L., Beringue, V., Litaise, C., Simon, S., Le Dur, A., Laude, H., Simmons, H., Lugan, S., Corbiere, F., Costes, P., Morel, N., Schelcher, F., & Lacroux, C. (2011). Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues. *PLoS Pathog*, *7*(2), e1001285. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001285

Andriezen, W. L. (1893). The Neuroglia Elements in the Human Brain. *Br Med J*, *2*(1700), 227-230. https://doi.org/10.1136/bmj.2.1700.227

Anitha, M., Vijay-Kumar, M., Sitaraman, S. V., Gewirtz, A. T., & Srinivasan, S. (2012). Gut microbial products regulate murine gastrointestinal motility via Toll-like receptor 4 signaling. *Gastroenterology*, *143*(4), 1006-1016 e1004. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.06.034

Ano, Y., Nakayama, H., Sakai, Y., Sakudo, A., Endo, M., Ebisu, S., Li, J., Uetsuka, K., Manabe, N., & Onodera, T. (2008). Incorporation of beta-amyloid protein through the bovine ileal epithelium before and after weaning: model for orally transmitted amyloidoses. *Microbiol Immunol*, *52*(8), 429-434. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2008.00054.x

Ano, Y., Sakudo, A., Nakayama, H., & Onodera, T. (2009). Uptake and dynamics of infectious prion protein in the intestine. *Protein Pept Lett*, *16*(3), 247-255. https://doi.org/10.2174/092986609787601642

Areskeviciute, A., Litman, T., Broholm, H., Melchior, L. C., Nielsen, P. R., Green, A., Eriksen, J. O., Smith, C., & Lund, E. L. (2020). Regional Differences in Neuroinflammation-Associated Gene Expression in the Brain of Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease Patients. *Int J Mol Sci*, *22*(1). https://doi.org/10.3390/ijms22010140

Arrasate, M., & Finkbeiner, S. (2012). Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol*, *238*(1), 1-11. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2011.12.013

Asuni, A. A., Gray, B., Bailey, J., Skipp, P., Perry, V. H., & O'Connor, V. (2014). Analysis of the hippocampal proteome in ME7 prion disease reveals a predominant astrocytic signature and highlights the brain-restricted production of clusterin in chronic neurodegeneration. *J Biol Chem*, *289*(7), 4532-4545. https://doi.org/10.1074/jbc.M113.502690

Au, N. P. B., & Ma, C. H. E. (2017). Recent Advances in the Study of Bipolar/Rod-Shaped Microglia and their Roles in Neurodegeneration. *Front Aging Neurosci*, *9*, 128. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00128

Aucouturier, P., Geissmann, F., Damotte, D., Saborio, G. P., Meeker, H. C., Kascsak, R., Kascsak, R., Carp, R. I., & Wisniewski, T. (2001). Infected splenic dendritic cells are sufficient for prion

transmission to the CNS in mouse scrapie. *J Clin Invest*, *108*(5), 703-708. https://doi.org/10.1172/JCI13155

Austbo, L., Espenes, A., Olsaker, I., Press, C. M., & Skretting, G. (2007). Increased PrP mRNA expression in lymphoid follicles of the ileal Peyer's patch of sheep experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol*, *88*(Pt 7), 2083-2090. https://doi.org/10.1099/vir.0.82791-0

Austbo, L., Kampmann, A., Muller-Ladner, U., Neumann, E., Olsaker, I., & Skretting, G. (2008). Identification of differentially expressed genes in ileal Peyer's patch of scrapie-infected sheep using RNA arbitrarily primed PCR. *BMC Vet Res*, *4*, 12. https://doi.org/10.1186/1746-6148-4-12

Babelhadj, B., Di Bari, M. A., Pirisinu, L., Chiappini, B., Gaouar, S. B. S., Riccardi, G., Marcon, S., Agrimi, U., Nonno, R., & Vaccari, G. (2018). Prion Disease in Dromedary Camels, Algeria. *Emerg Infect Dis*, *24*(6), 1029-1036. https://doi.org/10.3201/eid2406.172007

Bachiller, S., Jimenez-Ferrer, I., Paulus, A., Yang, Y., Swanberg, M., Deierborg, T., & Boza-Serrano, A. (2018). Microglia in Neurological Diseases: A Road Map to Brain-Disease Dependent-Inflammatory Response. *Front Cell Neurosci*, *12*, 488. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00488

Bachstetter, A. D., Van Eldik, L. J., Schmitt, F. A., Neltner, J. H., Ighodaro, E. T., Webster, S. J., Patel, E., Abner, E. L., Kryscio, R. J., & Nelson, P. T. (2015). Disease-related microglia heterogeneity in the hippocampus of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies, and hippocampal sclerosis of aging. *Acta Neuropathol Commun*, *3*, 32. https://doi.org/10.1186/s40478-015-0209-z

Bachy, V., Ballerini, C., Gourdain, P., Prignon, A., Iken, S., Antoine, N., Rosset, M., & Carnaud, C. (2010). Mouse vaccination with dendritic cells loaded with prion protein peptides overcomes tolerance and delays scrapie. *J Gen Virol*, *91*(Pt 3), 809-820. https://doi.org/10.1099/vir.0.013417-0

Barajon, I., Serrao, G., Arnaboldi, F., Opizzi, E., Ripamonti, G., Balsari, A., & Rumio, C. (2009). Toll-like receptors 3, 4, and 7 are expressed in the enteric nervous system and dorsal root ganglia. *J Histochem Cytochem*, *57*(11), 1013-1023. https://doi.org/10.1369/jhc.2009.953539

Barbalat, R., Ewald, S. E., Mouchess, M. L., & Barton, G. M. (2011). Nucleic acid recognition by the innate immune system. *Annu Rev Immunol*, *29*, 185-214. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101340

Barrairon, E. (1989). La découverte par Cuillé et Chelle des "maladies virales lentes" à l'Ecole Vétérinaire de Tolouse dans les années 30: un témoignage à l'ombre des "inventeurs"! *Bulletin de l'Acadêmie Vétérinaire de France*, 15-24.

Barrio, T., Filali, H., Otero, A., Sheleby-Elias, J., Marin, B., Vidal, E., Beringue, V., Torres, J. M., Groschup, M., Andreoletti, O., Badiola, J. J., & Bolea, R. (2020). Mixtures of prion substrains in natural scrapie cases revealed by ovinised murine models. *Sci Rep*, *10*(1), 5042. https://doi.org/10.1038/s41598-020-61977-1

Barton, G. M., & Kagan, J. C. (2009). A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol*, *9*(8), 535-542. https://doi.org/10.1038/nri2587

Bartz, J. C. (2016). Prion Strain Diversity. *Cold Spring Harb Perspect Med*, *6*(12). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a024349

Baskakov, I. V. (2021). On the reactive states of astrocytes in prion diseases. *Prion*, *15*(1), 87-93. https://doi.org/10.1080/19336896.2021.1930852

Baskakov, I. V., Katorcha, E., & Makarava, N. (2018). Prion Strain-Specific Structure and Pathology: A View from the Perspective of Glycobiology. *Viruses*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/v10120723

Baskakov, I. V., Legname, G., Baldwin, M. A., Prusiner, S. B., & Cohen, F. E. (2002). Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid. *J Biol Chem*, *277*(24), 21140-21148. https://doi.org/10.1074/jbc.M111402200

Beekes, M., & McBride, P. A. (2000). Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*, *278*(3), 181-184. https://doi.org/10.1016/s0304-3940(99)00934-9

Begara-McGorum, I., Gonzalez, L., Simmons, M., Hunter, N., Houston, F., & Jeffrey, M. (2002). Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol*, *127*(1), 59-68. https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0558

Benestad, S. L., Mitchell, G., Simmons, M., Ytrehus, B., & Vikoren, T. (2016). First case of chronic wasting disease in Europe in a Norwegian free-ranging reindeer. *Vet Res*, *47*(1), 88. https://doi.org/10.1186/s13567-016-0375-4

Benestad, S. L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M. A., & Bratberg, B. (2003). Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec*, *153*(7), 202-208. https://doi.org/10.1136/vr.153.7.202

Benilova, I., Reilly, M., Terry, C., Wenborn, A., Schmidt, C., Marinho, A. T., Risse, E., Al-Doujaily, H., Wiggins De Oliveira, M., Sandberg, M. K., Wadsworth, J. D. F., Jat, P. S., & Collinge, J. (2020). Highly infectious prions are not directly neurotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(38), 23815-23822. https://doi.org/10.1073/pnas.2007406117

Beraud, D., Hathaway, H. A., Trecki, J., Chasovskikh, S., Johnson, D. A., Johnson, J. A., Federoff, H. J., Shimoji, M., Mhyre, T. R., & Maguire-Zeiss, K. A. (2013). Microglial activation and antioxidant responses induced by the Parkinson's disease protein alpha-synuclein. *J Neuroimmune Pharmacol*, *8*(1), 94-117. https://doi.org/10.1007/s11481-012-9401-0

Beraud, D., Twomey, M., Bloom, B., Mittereder, A., Ton, V., Neitzke, K., Chasovskikh, S., Mhyre, T. R., & Maguire-Zeiss, K. A. (2011). alpha-Synuclein Alters Toll-Like Receptor Expression. *Front Neurosci*, *5*, 80. https://doi.org/10.3389/fnins.2011.00080

Beringue, V., Demoy, M., Lasmezas, C. I., Gouritin, B., Weingarten, C., Deslys, J. P., Andreux, J. P., Couvreur, P., & Dormont, D. (2000). Role of spleen macrophages in the clearance of scrapie agent early in pathogenesis. *J Pathol*, *190*(4), 495-502. https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(200003)190:4<495::AID-PATH535>3.0.CO;2-T

Beringue, V., Mallinson, G., Kaisar, M., Tayebi, M., Sattar, Z., Jackson, G., Anstee, D., Collinge, J., & Hawke, S. (2003). Regional heterogeneity of cellular prion protein isoforms in the mouse brain. *Brain*, *126*(Pt 9), 2065-2073. https://doi.org/10.1093/brain/awg205

Beringue, V., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2008). Prion agent diversity and species barrier. *Vet Res*, *39*(4), 47. https://doi.org/10.1051/vetres:2008024

Betmouni, S., Perry, V. H., & Gordon, J. L. (1996). Evidence for an early inflammatory response in the central nervous system of mice with scrapie. *Neuroscience*, *74*(1), 1-5. https://doi.org/10.1016/0306-4522(96)00212-6

Bir, S. C., Chernyshev, O. Y., & Minagar, A. (2018). Roles of Toll-Like Receptors in Pathophysiology of Alzheimer's Disease and Multiple Sclerosis. In *Neuroinflammation* (pp. 541-562). https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811709-5.00033-8

Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2004). Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, *304*(5673), 1014-1018. https://doi.org/10.1126/science.1096158

Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006a). On regulation of phagosome maturation and antigen presentation. *Nat Immunol*, *7*(10), 1029-1035. https://doi.org/10.1038/ni1006-1029

Blander, J. M., & Medzhitov, R. (2006b). Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature*, *440*(7085), 808-812. https://doi.org/10.1038/nature04596

Boche, D., Perry, V. H., & Nicoll, J. A. (2013). Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *39*(1), 3-18. https://doi.org/10.1111/nan.12011

Bolton, D. C., McKinley, M. P., & Prusiner, S. B. (1982). Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*, *218*(4579), 1309-1311. https://doi.org/10.1126/science.6815801

Bonnardel, J., Da Silva, C., Wagner, C., Bonifay, R., Chasson, L., Masse, M., Pollet, E., Dalod, M., Gorvel, J. P., & Lelouard, H. (2017). Distribution, location, and transcriptional profile of Peyer's patch conventional DC subsets at steady state and under TLR7 ligand stimulation. *Mucosal Immunol*, *10*(6), 1412-1430. https://doi.org/10.1038/mi.2017.30

Borchelt, D. R., Scott, M., Taraboulos, A., Stahl, N., & Prusiner, S. B. (1990). Scrapie and cellular prion proteins differ in their kinetics of synthesis and topology in cultured cells. *J Cell Biol*, *110*(3), 743-752. https://doi.org/10.1083/jcb.110.3.743

Botos, I., Segal, D. M., & Davies, D. R. (2011). The structural biology of Toll-like receptors. *Structure*, *19*(4), 447-459. https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004

Bradford, B. M., McGuire, L. I., Hume, D. A., Pridans, C., & Mabbott, N. A. (2021). Complete microglia deficiency accelerates prion disease without enhancing CNS prion accumulation. *bioRxiv*, 2021.2001.2005.425436. https://doi.org/10.1101/2021.01.05.425436

Bradford, B. M., Reizis, B., & Mabbott, N. A. (2017). Oral Prion Disease Pathogenesis Is Impeded in the Specific Absence of CXCR5-Expressing Dendritic Cells. *J Virol*, *91*(10). https://doi.org/10.1128/JVI.00124-17

Brown, D. R., Qin, K., Herms, J. W., Madlung, A., Manson, J., Strome, R., Fraser, P. E., Kruck, T., von Bohlen, A., Schulz-Schaeffer, W., Giese, A., Westaway, D., & Kretzschmar, H. (1997). The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature*, *390*(6661), 684-687. https://doi.org/10.1038/37783

Brown, D. R., Wong, B. S., Hafiz, F., Clive, C., Haswell, S. J., & Jones, I. M. (1999). Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J*, *344 Pt 1*, 1-5. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10548526

Brown, G. C., & Neher, J. J. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci*, *15*(4), 209-216. https://doi.org/10.1038/nrn3710

Brown, K. L., Stewart, K., Ritchie, D. L., Mabbott, N. A., Williams, A., Fraser, H., Morrison, W. I., & Bruce, M. E. (1999). Scrapie replication in lymphoid tissues depends on prion protein-expressing follicular dendritic cells. *Nat Med*, *5*(11), 1308-1312. https://doi.org/10.1038/15264

Bruce, M. E., Brown, K. L., Mabbott, N. A., Farquhar, C. F., & Jeffrey, M. (2000). Follicular dendritic cells in TSE pathogenesis. *Immunol Today*, *21*(9), 442-446. https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01696-0

Bruscia, E. M., Zhang, P. X., Satoh, A., Caputo, C., Medzhitov, R., Shenoy, A., Egan, M. E., & Krause, D. S. (2011). Abnormal trafficking and degradation of TLR4 underlie the elevated inflammatory response in cystic fibrosis. *J Immunol*, *186*(12), 6990-6998. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100396

Bsibsi, M., Persoon-Deen, C., Verwer, R. W., Meeuwsen, S., Ravid, R., & Van Noort, J. M. (2006). Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia*, *53*(7), 688-695. https://doi.org/10.1002/glia.20328

Bsibsi, M., Ravid, R., Gveric, D., & van Noort, J. M. (2002). Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*, *61*(11), 1013-1021. https://doi.org/10.1093/jnen/61.11.1013

Budka, H. (2003). Neuropathology of prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 121-130. https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.121

Bueler, H., Aguzzi, A., Sailer, A., Greiner, R. A., Autenried, P., Aguet, M., & Weissmann, C. (1993). Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell*, *73*(7), 1339-1347. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90360-3

Campbell, I. L., Abraham, C. R., Masliah, E., Kemper, P., Inglis, J. D., Oldstone, M. B., & Mucke, L. (1993). Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(21), 10061-10065. https://doi.org/10.1073/pnas.90.21.10061

Caputi, V., Marsilio, I., Cerantola, S., Roozfarakh, M., Lante, I., Galuppini, F., Rugge, M., Napoli, E., Giulivi, C., Orso, G., & Giron, M. C. (2017). Toll-Like Receptor 4 Modulates Small Intestine Neuromuscular Function through Nitrergic and Purinergic Pathways. *Front Pharmacol*, *8*, 350. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00350

Carlson, G. A., Kingsbury, D. T., Goodman, P. A., Coleman, S., Marshall, S. T., DeArmond, S., Westaway, D., & Prusiner, S. B. (1986). Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes. *Cell*, *46*(4), 503-511. https://doi.org/10.1016/0092-8674(86)90875-5

Carnaud, C., & Bachy, V. (2010). Cell-based immunotherapy of prion diseases by adoptive transfer of antigen-loaded dendritic cells or antigen-primed CD(4+) T lymphocytes. *Prion*, *4*(2), 66-71. https://doi.org/10.4161/pri.4.2.12597

Carroll, J. A., & Chesebro, B. (2019). Neuroinflammation, Microglia, and Cell-Association during Prion Disease. *Viruses*, *11*(1). https://doi.org/10.3390/v11010065

Carroll, J. A., Race, B., Williams, K., & Chesebro, B. (2018). Toll-like receptor 2 confers partial neuroprotection during prion disease. *PLoS One*, *13*(12), e0208559. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208559

Carroll, J. A., Race, B., Williams, K., Striebel, J., & Chesebro, B. (2018). Microglia Are Critical in Host Defense against Prion Disease. *J Virol*, *92*(15). https://doi.org/10.1128/JVI.00549-18

Carroll, J. A., Race, B., Williams, K., Striebel, J., & Chesebro, B. (2020). RNA-seq and network analysis reveal unique glial gene expression signatures during prion infection. *Mol Brain*, *13*(1), 71. https://doi.org/10.1186/s13041-020-00610-8

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*(4), e1005551. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005551

Cashman, N. R., Loertscher, R., Nalbantoglu, J., Shaw, I., Kascsak, R. J., Bolton, D. C., & Bendheim, P. E. (1990). Cellular isoform of the scrapie agent protein participates in lymphocyte activation. *Cell*, *61*(1), 185-192. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90225-4

Cashman, S. B., & Morgan, J. G. (2009). Transcriptional analysis of Toll-like receptors expression in M cells. *Mol Immunol*, *47*(2-3), 365-372. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2009.09.007

Cassard, H., Torres, J. M., Lacroux, C., Douet, J. Y., Benestad, S. L., Lantier, F., Lugan, S., Lantier, I., Costes, P., Aron, N., Reine, F., Herzog, L., Espinosa, J. C., Beringue, V., & Andreoletti, O. (2014). Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions. *Nat Commun*, *5*, 5821. https://doi.org/10.1038/ncomms6821

Castilla, J., Hetz, C., & Soto, C. (2004). Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med*, *4*(4), 397-403. https://doi.org/10.2174/1566524043360654

Castilla, J., Saa, P., Hetz, C., & Soto, C. (2005). In vitro generation of infectious scrapie prions. *Cell*, *121*(2), 195-206. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.011

Castro-Seoane, R., Hummerich, H., Sweeting, T., Tattum, M. H., Linehan, J. M., Fernandez de Marco, M., Brandner, S., Collinge, J., & Klohn, P. C. (2012). Plasmacytoid dendritic cells sequester high prion titres at early stages of prion infection. *PLoS Pathog*, *8*(2), e1002538. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002538

Casula, M., Iyer, A. M., Spliet, W. G., Anink, J. J., Steentjes, K., Sta, M., Troost, D., & Aronica, E. (2011). Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience*, *179*, 233-243. https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.02.001

Cerantola, S., Caputi, V., Marsilio, I., Ridolfi, M., Faggin, S., Bistoletti, M., Giaroni, C., & Giron, M. C. (2020). Involvement of Enteric Glia in Small Intestine Neuromuscular Dysfunction of Toll-Like Receptor 4-Deficient Mice. *Cells*, *9*(4). https://doi.org/10.3390/cells9040838

Chabot, S., Wagner, J. S., Farrant, S., & Neutra, M. R. (2006). TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *J Immunol*, *176*(7), 4275-4283. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4275

Chabot, S. M., Shawi, M., Eaves-Pyles, T., & Neutra, M. R. (2008). Effects of flagellin on the functions of follicle-associated epithelium. *J Infect Dis*, *198*(6), 907-910. https://doi.org/10.1086/591056

Chakrabarty, P., Li, A., Ladd, T. B., Strickland, M. R., Koller, E. J., Burgess, J. D., Funk, C. C., Cruz, P. E., Allen, M., Yaroshenko, M., Wang, X., Younkin, C., Reddy, J., Lohrer, B., Mehrke, L., Moore, B. D., Liu, X., Ceballos-Diaz, C., Rosario, A. M., Medway, C., Janus, C., Li, H. D., Dickson, D. W., Giasson, B. I., Price, N. D., Younkin, S. G., Ertekin-Taner, N., & Golde, T. E. (2018). TLR5 decoy receptor as a novel anti-amyloid therapeutic for Alzheimer's disease. *J Exp Med*, *215*(9), 2247-2264. https://doi.org/10.1084/jem.20180484

Chen, K., Huang, J., Liu, Y., Gong, W., Cui, Y., & Wang, J. M. (2009). Synergy of TRIF-dependent TLR3 and MyD88-dependent TLR7 in up-regulating expression of mouse FPR2, a promiscuous G-protein-coupled receptor, in microglial cells. *J Neuroimmunol*, *213*(1-2), 69-77. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.05.018

Chen, K., Iribarren, P., Hu, J., Chen, J., Gong, W., Cho, E. H., Lockett, S., Dunlop, N. M., & Wang, J. M. (2006). Activation of Toll-like receptor 2 on microglia promotes cell uptake of Alzheimer disease-associated amyloid beta peptide. *J Biol Chem*, *281*(6), 3651-3659. https://doi.org/10.1074/jbc.M508125200

Cherry, P., & Gilch, S. (2020). The Role of Vesicle Trafficking Defects in the Pathogenesis of Prion and Prion-Like Disorders. *Int J Mol Sci*, *21*(19). https://doi.org/10.3390/ijms21197016

Chesebro, B., Trifilo, M., Race, R., Meade-White, K., Teng, C., LaCasse, R., Raymond, L., Favara, C., Baron, G., Priola, S., Caughey, B., Masliah, E., & Oldstone, M. (2005). Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie. *Science*, *308*(5727), 1435-1439. https://doi.org/10.1126/science.1110837

Chieppa, M., Rescigno, M., Huang, A. Y., & Germain, R. N. (2006). Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med*, *203*(13), 2841-2852. https://doi.org/10.1084/jem.20061884

Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., Sobenin, I. A., & Bobryshev, Y. V. (2014). Plasmacytoid dendritic cells: development, functions, and role in atherosclerotic inflammation. *Front Physiol*, *5*, 279. https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00279

Chung, W. S., Allen, N. J., & Eroglu, C. (2015). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(9), a020370. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020370

Ciesielska, A., Matyjek, M., & Kwiatkowska, K. (2021). TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci*, *78*(4), 1233-1261. https://doi.org/10.1007/s00018-020-03656-y

Cohen, F. E., & Prusiner, S. B. (1998). Pathologic conformations of prion proteins. *Annu Rev Biochem*, *67*, 793-819. https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.793

Coitinho, A. S., Freitas, A. R., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Roesler, R., Walz, R., Rossato, J. I., Cammarota, M., Izquierdo, I., Martins, V. R., & Brentani, R. R. (2006). The interaction between prion protein and laminin modulates memory consolidation. *Eur J Neurosci*, *24*(11), 3255-3264. https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.05156.x

Coitinho, A. S., Lopes, M. H., Hajj, G. N., Rossato, J. I., Freitas, A. R., Castro, C. C., Cammarota, M., Brentani, R. R., Izquierdo, I., & Martins, V. R. (2007). Short-term memory formation and

long-term memory consolidation are enhanced by cellular prion association to stress-inducible protein 1. *Neurobiol Dis*, *26*(1), 282-290. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2007.01.005

Collinge, J. (2001). Prion diseases of humans and animals: their causes and molecular basis. *Annu Rev Neurosci*, *24*, 519-550. https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.24.1.519

Collinge, J., & Clarke, A. R. (2007). A general model of prion strains and their pathogenicity. *Science*, *318*(5852), 930-936. https://doi.org/10.1126/science.1138718

Collinge, J., Sidle, K. C., Meads, J., Ironside, J., & Hill, A. F. (1996). Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*, *383*(6602), 685-690. https://doi.org/10.1038/383685a0

Colonna, M., Trinchieri, G., & Liu, Y. J. (2004). Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol*, *5*(12), 1219-1226. https://doi.org/10.1038/ni1141

Colton, C., & Wilcock, D. M. (2010). Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, *9*(2), 174-191. https://doi.org/10.2174/187152710791012053

Contractor, N., Louten, J., Kim, L., Biron, C. A., & Kelsall, B. L. (2007). Cutting edge: Peyer's patch plasmacytoid dendritic cells (pDCs) produce low levels of type I interferons: possible role for IL-10, TGFbeta, and prostaglandin E2 in conditioning a unique mucosal pDC phenotype. *J Immunol*, *179*(5), 2690-2694. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.5.2690

Cook, D. N., Pisetsky, D. S., & Schwartz, D. A. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*, *5*(10), 975-979. https://doi.org/10.1038/ni1116

Cordier-Dirikoc, S., & Chabry, J. (2008). Temporary depletion of CD11c+ dendritic cells delays lymphoinvasion after intraperitonal scrapie infection. *J Virol*, *82*(17), 8933-8936. https://doi.org/10.1128/JVI.02440-07

Corr, S. C., Gahan, C. C., & Hill, C. (2008). M-cells: origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *52*(1), 2-12. https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00359.x

Crespo, I., Roomp, K., Jurkowski, W., Kitano, H., & del Sol, A. (2012). Gene regulatory network analysis supports inflammation as a key neurodegeneration process in prion disease. *BMC Syst Biol*, *6*, 132. https://doi.org/10.1186/1752-0509-6-132

Cribbs, D. H., Berchtold, N. C., Perreau, V., Coleman, P. D., Rogers, J., Tenner, A. J., & Cotman, C. W. (2012). Extensive innate immune gene activation accompanies brain aging, increasing vulnerability to cognitive decline and neurodegeneration: a microarray study. *J Neuroinflammation*, *9*, 179. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-179

Cronier, S., Laude, H., & Peyrin, J. M. (2004). Prions can infect primary cultured neurons and astrocytes and promote neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(33), 12271-12276. https://doi.org/10.1073/pnas.0402725101

Crowe, A. R., & Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio Protoc*, *9*(24). https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3465

Cui, W., Sun, C., Ma, Y., Wang, S., Wang, X., & Zhang, Y. (2020). Inhibition of TLR4 Induces M2 Microglial Polarization and Provides Neuroprotection via the NLRP3 Inflammasome in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, *14*, 444. https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00444

Da Silva, C., Wagner, C., Bonnardel, J., Gorvel, J. P., & Lelouard, H. (2017). The Peyer's Patch Mononuclear Phagocyte System at Steady State and during Infection. *Front Immunol*, *8*, 1254. https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01254

Dawson, T. M., Golde, T. E., & Lagier-Tourenne, C. (2018). Animal models of neurodegenerative diseases. *Nat Neurosci*, *21*(10), 1370-1379. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0236-8

De Biase, L. M., Schuebel, K. E., Fusfeld, Z. H., Jair, K., Hawes, I. A., Cimbro, R., Zhang, H. Y., Liu, Q. R., Shen, H., Xi, Z. X., Goldman, D., & Bonci, A. (2017). Local Cues Establish and Maintain Region-Specific Phenotypes of Basal Ganglia Microglia. *Neuron*, *95*(2), 341-356 e346. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.06.020

De Paola, M., Mariani, A., Bigini, P., Peviani, M., Ferrara, G., Molteni, M., Gemma, S., Veglianese, P., Castellaneta, V., Boldrin, V., Rossetti, C., Chiabrando, C., Forloni, G., Mennini, T., & Fanelli, R. (2012). Neuroprotective effects of toll-like receptor 4 antagonism in spinal cord cultures and in a mouse model of motor neuron degeneration. *Mol Med*, *18*, 971-981. https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00020

de Vega, A., Gasa, J., Castrillo, C., & Guada, J. A. (1998). Passage through the rumen and the large intestine of sheep estimated from faecal marker excretion curves and slaughter trials. *Br J Nutr*, *80*(4), 381-389. https://doi.org/10.1079/096582198388337

Defaweux, V., Dorban, G., Demonceau, C., Piret, J., Jolois, O., Thellin, O., Thielen, C., Heinen, E., & Antoine, N. (2005). Interfaces between dendritic cells, other immune cells, and nerve fibres in mouse Peyer's patches: potential sites for neuroinvasion in prion diseases. *Microsc Res Tech*, *66*(1), 1-9. https://doi.org/10.1002/jemt.20135

Delamarre, L., Pack, M., Chang, H., Mellman, I., & Trombetta, E. S. (2005). Differential lysosomal proteolysis in antigen-presenting cells determines antigen fate. *Science*, *307*(5715), 1630-1634. https://doi.org/10.1126/science.1108003

Dervishi, E., Lam, T. H., Dunn, S. M., Zwierzchowski, G., Saleem, F., Wishart, D. S., & Ametaj, B. N. (2015). Recombinant mouse prion protein alone or in combination with lipopolysaccharide alters expression of innate immunity genes in the colon of mice. *Prion*, *9*(1), 59-73. https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1019694

Detwiler, L. A., & Baylis, M. (2003). The epidemiology of scrapie. *Rev Sci Tech*, *22*(1), 121-143. https://doi.org/10.20506/rst.22.1.1386

Di Gioia, M., & Zanoni, I. (2015). Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Mol Immunol*, *63*(2), 143-152. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.05.008

Diaz, C., Vitezica, Z. G., Rupp, R., Andreoletti, O., & Elsen, J. M. (2005). Polygenic variation and transmission factors involved in the resistance/susceptibility to scrapie in a Romanov flock. *J Gen Virol*, *86*(Pt 3), 849-857. https://doi.org/10.1099/vir.0.80412-0

Dickinson, A. G. (1976). Scrapie in sheep and goats. *Front Biol*, *44*, 209-241. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/821790

Dickinson, A. G., & Outram, G. W. (1988). Genetic aspects of unconventional virus infections: the basis of the virino hypothesis. *Ciba Found Symp*, *135*, 63-83. https://doi.org/10.1002/9780470513613.ch5

Dickinson, A. G., Young, G. B., Stamp, J. T., & Renwick, C. C. (1965). An analysis of natural scrapie in Suffolk sheep. *Heredity (Edinb)*, *20*(4), 485-503. https://doi.org/10.1038/hdy.1965.64

Dombkowski, A. A., Cukovic, D., Bagla, S., Jones, M., Caruso, J. A., Chugani, H. T., & Chugani, D. C. (2019). TLR7 activation in epilepsy of tuberous sclerosis complex. *Inflamm Res*, *68*(12), 993-998. https://doi.org/10.1007/s00011-019-01283-3

Donaldson, D. S., Else, K. J., & Mabbott, N. A. (2015). The Gut-Associated Lymphoid Tissues in the Small Intestine, Not the Large Intestine, Play a Major Role in Oral Prion Disease Pathogenesis. *J Virol*, *89*(18), 9532-9547. https://doi.org/10.1128/JVI.01544-15

Donaldson, D. S., Kobayashi, A., Ohno, H., Yagita, H., Williams, I. R., & Mabbott, N. A. (2012). M cell-depletion blocks oral prion disease pathogenesis. *Mucosal Immunol*, *5*(2), 216-225. https://doi.org/10.1038/mi.2011.68

Donaldson, D. S., Sehgal, A., Rios, D., Williams, I. R., & Mabbott, N. A. (2016). Increased Abundance of M Cells in the Gut Epithelium Dramatically Enhances Oral Prion Disease Susceptibility. *PLoS Pathog*, *12*(12), e1006075. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006075

Doorn, K. J., Moors, T., Drukarch, B., van de Berg, W., Lucassen, P. J., & van Dam, A. M. (2014). Microglial phenotypes and toll-like receptor 2 in the substantia nigra and hippocampus of incidental Lewy body disease cases and Parkinson's disease patients. *Acta Neuropathol Commun*, *2*, 90. https://doi.org/10.1186/s40478-014-0090-1

Douet, J. Y., Lacroux, C., Litaise, C., Lugan, S., Corbiere, F., Arnold, M., Simmons, H., Aron, N., Costes, P., Tillier, C., Cassard, H., & Andreoletti, O. (2016). Mononucleated Blood Cell Populations Display Different Abilities To Transmit Prion Disease by the Transfusion Route. *J Virol*, *90*(7), 3439-3445. https://doi.org/10.1128/JVI.02783-15

EFSA. (2020). The European Union summary report on surveillance for the presence of transmissible spongiform encephalopathies (TSE) in 2019. *EFSA Journal*, *18*(11). https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6303

El Khoury, J. B., Moore, K. J., Means, T. K., Leung, J., Terada, K., Toft, M., Freeman, M. W., & Luster, A. D. (2003). CD36 mediates the innate host response to beta-amyloid. *J Exp Med*, *197*(12), 1657-1666. https://doi.org/10.1084/jem.20021546

El Shikh, M. E., El Sayed, R. M., Wu, Y., Szakal, A. K., & Tew, J. G. (2007). TLR4 on follicular dendritic cells: an activation pathway that promotes accessory activity. *J Immunol*, *179*(7), 4444-4450. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.7.4444

Elsen, J. M., Amigues, Y., Schelcher, F., Ducrocq, V., Andreoletti, O., Eychenne, F., Khang, J. V., Poivey, J. P., Lantier, F., & Laplanche, J. L. (1999). Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailed analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. *Arch Virol*, *144*(3), 431-445. https://doi.org/10.1007/s007050050516

Emsley, J. G., & Macklis, J. D. (2006). Astroglial heterogeneity closely reflects the neuronal-defined anatomy of the adult murine CNS. *Neuron Glia Biol*, *2*(3), 175-186. https://doi.org/10.1017/S1740925X06000202

Endemann, G., Stanton, L. W., Madden, K. S., Bryant, C. M., White, R. T., & Protter, A. A. (1993). CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem*, *268*(16), 11811-11816. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7685021

Ersdal, C., Ulvund, M. J., Benestad, S. L., & Tranulis, M. A. (2003). Accumulation of pathogenic prion protein (PrPSc) in nervous and lymphoid tissues of sheep with subclinical scrapie. *Vet Pathol*, *40*(2), 164-174. https://doi.org/10.1354/vp.40-2-164

Ersdal, C., Ulvund, M. J., Espenes, A., Benestad, S. L., Sarradin, P., & Landsverk, T. (2005). Mapping PrPSc propagation in experimental and natural scrapie in sheep with different PrP genotypes. *Vet Pathol*, *42*(3), 258-274. https://doi.org/10.1354/vp.42-3-258

Espenes, A., Press, C. M., Landsverk, T., Tranulis, M. A., Aleksandersen, M., Gunnes, G., Benestad, S. L., Fuglestveit, R., & Ulvund, M. J. (2006). Detection of PrP(Sc) in rectal biopsy and necropsy samples from sheep with experimental scrapie. *J Comp Pathol*, *134*(2-3), 115-125. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2005.08.001

Ewald, S. E., Lee, B. L., Lau, L., Wickliffe, K. E., Shi, G. P., Chapman, H. A., & Barton, G. M. (2008). The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature*, *456*(7222), 658-662. https://doi.org/10.1038/nature07405

Farhat, K., Riekenberg, S., Heine, H., Debarry, J., Lang, R., Mages, J., Buwitt-Beckmann, U., Roschmann, K., Jung, G., Wiesmuller, K. H., & Ulmer, A. J. (2008). Heterodimerization of TLR2 with TLR1 or TLR6 expands the ligand spectrum but does not lead to differential signaling. *J Leukoc Biol*, *83*(3), 692-701. https://doi.org/10.1189/jlb.0807586

Fassbender, K., Walter, S., Kuhl, S., Landmann, R., Ishii, K., Bertsch, T., Stalder, A. K., Muehlhauser, F., Liu, Y., Ulmer, A. J., Rivest, S., Lentschat, A., Gulbins, E., Jucker, M., Staufenbiel, M., Brechtel, K., Walter, J., Multhaup, G., Penke, B., Adachi, Y., Hartmann, T., & Beyreuther, K. (2004). The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J*, *18*(1), 203-205. https://doi.org/10.1096/fj.03-0364fje

Fellner, A., Barhum, Y., Angel, A., Perets, N., Steiner, I., Offen, D., & Lev, N. (2017). Toll-Like Receptor-4 Inhibitor TAK-242 Attenuates Motor Dysfunction and Spinal Cord Pathology in an Amyotrophic Lateral Sclerosis Mouse Model. *Int J Mol Sci*, *18*(8). https://doi.org/10.3390/ijms18081666

Felten, D. L., Felten, S. Y., Carlson, S. L., Olschowka, J. A., & Livnat, S. (1985). Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol*, *135*(2 Suppl), 755s-765s. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2861231

Fenhammar, J., Rundgren, M., Forestier, J., Kalman, S., Eriksson, S., & Frithiof, R. (2011). Toll-like receptor 4 inhibitor TAK-242 attenuates acute kidney injury in endotoxemic sheep. *Anesthesiology*, *114*(5), 1130-1137. https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e31820b8b44

Fernandez-Arjona, M. D. M., Grondona, J. M., Granados-Duran, P., Fernandez-Llebrez, P., & Lopez-Avalos, M. D. (2017). Microglia Morphological Categorization in a Rat Model of Neuroinflammation by Hierarchical Cluster and Principal Components Analysis. *Front Cell Neurosci*, *11*, 235. https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00235

Ferrer, I. (2017). Diversity of astroglial responses across human neurodegenerative disorders and brain aging. *Brain Pathol*, *27*(5), 645-674. https://doi.org/10.1111/bpa.12538

Fevrier, B., Vilette, D., Archer, F., Loew, D., Faigle, W., Vidal, M., Laude, H., & Raposo, G. (2004). Cells release prions in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9683-9688. https://doi.org/10.1073/pnas.0308413101

Fiebich, B. L., Batista, C. R. A., Saliba, S. W., Yousif, N. M., & de Oliveira, A. C. P. (2018). Role of Microglia TLRs in Neurodegeneration. *Front Cell Neurosci*, *12*, 329. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00329

Field, R., Campion, S., Warren, C., Murray, C., & Cunningham, C. (2010). Systemic challenge with the TLR3 agonist poly I:C induces amplified IFNalpha/beta and IL-1beta responses in the diseased brain and exacerbates chronic neurodegeneration. *Brain Behav Immun*, *24*(6), 996-1007. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2010.04.004

Filali, H., Martin-Burriel, I., Harders, F., Varona, L., Hedman, C., Mediano, D. R., Monzon, M., Bossers, A., Badiola, J. J., & Bolea, R. (2014). Gene expression profiling of mesenteric lymph nodes from sheep with natural scrapie. *BMC Genomics*, *15*, 59. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-59

Flores-Langarica, A., Marshall, J. L., Hitchcock, J., Cook, C., Jobanputra, J., Bobat, S., Ross, E. A., Coughlan, R. E., Henderson, I. R., Uematsu, S., Akira, S., & Cunningham, A. F. (2012). Systemic flagellin immunization stimulates mucosal CD103+ dendritic cells and drives Foxp3+ regulatory T cell and IgA responses in the mesenteric lymph node. *J Immunol*, *189*(12), 5745-5754. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202283

Foster, J. D., Goldmann, W., & Hunter, N. (2013). Evidence in sheep for pre-natal transmission of scrapie to lambs from infected mothers. *PLoS One*, *8*(11), e79433. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079433

Foster, J. D., Parnham, D., Chong, A., Goldmann, W., & Hunter, N. (2001). Clinical signs, histopathology and genetics of experimental transmission of BSE and natural scrapie to sheep and goats. *Vet Rec*, *148*(6), 165-171. https://doi.org/10.1136/vr.148.6.165

Foster, J. D., Parnham, D. W., Hunter, N., & Bruce, M. (2001). Distribution of the prion protein in sheep terminally affected with BSE following experimental oral transmission. *J Gen Virol*, *82*(Pt 10), 2319-2326. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2319

Foster, N., & Macpherson, G. G. (2010). Murine cecal patch M cells transport infectious prions in vivo. *J Infect Dis*, *202*(12), 1916-1919. https://doi.org/10.1086/657415

Franceschini, A., Strammiello, R., Capellari, S., Giese, A., & Parchi, P. (2018). Regional pattern of microgliosis in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in relation to phenotypic variants and disease progression. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *44*(6), 574-589. https://doi.org/10.1111/nan.12461

Frank, S., Copanaki, E., Burbach, G. J., Muller, U. C., & Deller, T. (2009). Differential regulation of toll-like receptor mRNAs in amyloid plaque-associated brain tissue of aged APP23 transgenic mice. *Neurosci Lett*, *453*(1), 41-44. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.01.075

Fraser, H., & Bruce, M. (1973). Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources. *Lancet*, *1*(7803), 617-618. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(73)90775-7

Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1968). The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*, *78*(3), 301-311. https://doi.org/10.1016/0021-9975(68)90006-6

Fraser, H., & Dickinson, A. G. (1973). Scrapie in mice. Agent-strain differences in the distribution and intensity of grey matter vacuolation. *J Comp Pathol*, *83*(1), 29-40. https://doi.org/10.1016/0021-9975(73)90024-8

Frederiksen, H. R., Haukedal, H., & Freude, K. (2019). Cell Type Specific Expression of Toll-Like Receptors in Human Brains and Implications in Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*, *2019*, 7420189. https://doi.org/10.1155/2019/7420189

Frigg, R., Klein, M. A., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., & Aguzzi, A. (1999). Scrapie pathogenesis in subclinically infected B-cell-deficient mice. *J Virol*, *73*(11), 9584-9588. https://doi.org/10.1128/JVI.73.11.9584-9588.1999

Fucikova, J., Moserova, I., Urbanova, L., Bezu, L., Kepp, O., Cremer, I., Salek, C., Strnad, P., Kroemer, G., Galluzzi, L., & Spisek, R. (2015). Prognostic and Predictive Value of DAMPs and DAMP-Associated Processes in Cancer. *Front Immunol*, *6*, 402. https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00402

Gambetti, P., Dong, Z., Yuan, J., Xiao, X., Zheng, M., Alshekhlee, A., Castellani, R., Cohen, M., Barria, M. A., Gonzalez-Romero, D., Belay, E. D., Schonberger, L. B., Marder, K., Harris, C., Burke, J. R., Montine, T., Wisniewski, T., Dickson, D. W., Soto, C., Hulette, C. M., Mastrianni, J. A., Kong, Q., & Zou, W. Q. (2008). A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease. *Ann Neurol*, *63*(6), 697-708. https://doi.org/10.1002/ana.21420

Garces, M., Guijarro, I. M., Ritchie, D. L., Badiola, J. J., & Monzon, M. (2021). Novel Morphological Glial Alterations in the Spectrum of Prion Disease Types: A Focus on Common Findings. *Pathogens*, *10*(5). https://doi.org/10.3390/pathogens10050596

Garcia-Crespo, D., Juste, R. A., & Hurtado, A. (2005). Selection of ovine housekeeping genes for normalisation by real-time RT-PCR; analysis of PrP gene expression and genetic susceptibility to scrapie. *BMC Vet Res*, *1*, 3. https://doi.org/10.1186/1746-6148-1-3

Garcia-Marin, V., Garcia-Lopez, P., & Freire, M. (2007). Cajal's contributions to glia research. *Trends Neurosci*, *30*(9), 479-487. https://doi.org/10.1016/j.tins.2007.06.008

Garin, A., Meyer-Hermann, M., Contie, M., Figge, M. T., Buatois, V., Gunzer, M., Toellner, K. M., Elson, G., & Kosco-Vilbois, M. H. (2010). Toll-like receptor 4 signaling by follicular dendritic cells is pivotal for germinal center onset and affinity maturation. *Immunity*, *33*(1), 84-95. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2010.07.005

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*(12), e27525. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027525

Garza, M. C., Monzon, M., Marin, B., Badiola, J. J., & Monleon, E. (2014). Distribution of peripheral PrP(Sc) in sheep with naturally acquired scrapie. *PLoS One*, *9*(5), e97768. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097768

Georgsson, G., Sigurdarson, S., & Brown, P. (2006). Infectious agent of sheep scrapie may persist in the environment for at least 16 years. *J Gen Virol*, *87*(Pt 12), 3737-3740. https://doi.org/10.1099/vir.0.82011-0

Gilch, S., Schmitz, F., Aguib, Y., Kehler, C., Bulow, S., Bauer, S., Kremmer, E., & Schatzl, H. M. (2007). CpG and LPS can interfere negatively with prion clearance in macrophage and microglial cells. *FEBS J*, *274*(22), 5834-5844. https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06105.x

Gill, A. C., & Castle, A. R. (2018). The cellular and pathologic prion protein. *Handb Clin Neurol*, *153*, 21-44. https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63945-5.00002-7

Giordano, K. R., Denman, C. R., Dubisch, P. S., Akhter, M., & Lifshitz, J. (2021). An update on the rod microglia variant in experimental and clinical brain injury and disease. *Brain Commun*, *3*(1), fcaa227. https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa227

Glaysher, B. R., & Mabbott, N. A. (2007). Role of the GALT in scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol*, *178*(6), 3757-3766. https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.6.3757

Glezer, I., Bittencourt, J. C., & Rivest, S. (2009). Neuronal expression of Cd36, Cd44, and Cd83 antigen transcripts maps to distinct and specific murine brain circuits. *J Comp Neurol*, *517*(6), 906-924. https://doi.org/10.1002/cne.22185

Goldmann, W., Baylis, M., Chihota, C., Stevenson, E., & Hunter, N. (2005). Frequencies of PrP gene haplotypes in British sheep flocks and the implications for breeding programmes. *J Appl Microbiol*, *98*(6), 1294-1302. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02568.x

Goldmann, W., Hunter, N., Benson, G., Foster, J. D., & Hope, J. (1991). Different scrapie-associated fibril proteins (PrP) are encoded by lines of sheep selected for different alleles of the Sip gene. *J Gen Virol*, *72 (Pt 10)*, 2411-2417. https://doi.org/10.1099/0022-1317-72-10-2411

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*(7), 2476-2480. https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2476

Goldmann, W., Hunter, N., Smith, G., Foster, J., & Hope, J. (1994). PrP genotype and agent effects in scrapie: change in allelic interaction with different isolates of agent in sheep, a natural host of scrapie. *J Gen Virol*, *75 (Pt 5)*, 989-995. https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-5-989

Gomez-Nicola, D., Fransen, N. L., Suzzi, S., & Perry, V. H. (2013). Regulation of microglial proliferation during chronic neurodegeneration. *J Neurosci*, *33*(6), 2481-2493. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4440-12.2013

Gonzalez, L., Dagleish, M. P., Bellworthy, S. J., Siso, S., Stack, M. J., Chaplin, M. J., Davis, L. A., Hawkins, S. A., Hughes, J., & Jeffrey, M. (2006). Postmortem diagnosis of preclinical and clinical scrapie in sheep by the detection of disease-associated PrP in their rectal mucosa. *Vet Rec*, *158*(10), 325-331. https://doi.org/10.1136/vr.158.10.325

Gonzalez, L., Jeffrey, M., Dagleish, M. P., Goldmann, W., Siso, S., Eaton, S. L., Martin, S., Finlayson, J., Stewart, P., Steele, P., Pang, Y., Hamilton, S., Reid, H. W., & Chianini, F. (2012). Susceptibility to scrapie and disease phenotype in sheep: cross-PRNP genotype experimental transmissions with natural sources. *Vet Res*, *43*, 55. https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-55

Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., & Jeffrey, M. (2002). Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*, *126*(1), 17-29. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0516

Gonzalez, L., Martin, S., & Jeffrey, M. (2003). Distinct profiles of PrP(d) immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol*, *84*(Pt 5), 1339-1350. https://doi.org/10.1099/vir.0.18800-0

Gonzalez, L., Pitarch, J. L., Martin, S., Thurston, L., Moore, J., Acin, C., & Jeffrey, M. (2014). Identical pathogenesis and neuropathological phenotype of scrapie in valine, arginine, glutamine/valine, arginine, glutamine sheep infected experimentally by the oral and conjunctival routes. *J Comp Pathol*, *150*(1), 47-56. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.06.006

Gonzalez, L., Pitarch, J. L., Martin, S., Thurston, L., Simmons, H., Acin, C., & Jeffrey, M. (2014). Influence of polymorphisms in the prion protein gene on the pathogenesis and neuropathological phenotype of sheep scrapie after oral infection. *J Comp Pathol*, *150*(1), 57-70. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2013.10.001

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol*, *3*(1), 23-35. https://doi.org/10.1038/nri978

Gorina, R., Font-Nieves, M., Marquez-Kisinousky, L., Santalucia, T., & Planas, A. M. (2011). Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay

between MyD88-dependent NFkappaB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. *Glia*, *59*(2), 242-255. https://doi.org/10.1002/glia.21094

Gossner, A., Roupaka, S., Foster, J., Hunter, N., & Hopkins, J. (2011). Transcriptional profiling of peripheral lymphoid tissue reveals genes and networks linked to SSBP/1 scrapie pathology in sheep. *Vet Microbiol*, *153*(3-4), 218-228. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.036

Gossner, A. G., & Hopkins, J. (2015). The effect of PrP(Sc) accumulation on inflammatory gene expression within sheep peripheral lymphoid tissue. *Vet Microbiol*, *181*(3-4), 204-211. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.10.013

Gotur, S. P., & Wadhwan, V. (2020). Tingible body macrophages. *J Oral Maxillofac Pathol*, *24*(3), 418-420. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_314_20

Gough, K. C., Rees, H. C., Ives, S. E., & Maddison, B. C. (2015). Methods for Differentiating Prion Types in Food-Producing Animals. *Biology (Basel)*, *4*(4), 785-813. https://doi.org/10.3390/biology4040785

Grasa, L., Abecia, L., Forcen, R., Castro, M., de Jalon, J. A., Latorre, E., Alcalde, A. I., & Murillo, M. D. (2015). Antibiotic-Induced Depletion of Murine Microbiota Induces Mild Inflammation and Changes in Toll-Like Receptor Patterns and Intestinal Motility. *Microb Ecol*, *70*(3), 835-848. https://doi.org/10.1007/s00248-015-0613-8

Greenlee, J. J., Smith, J. D., & Hamir, A. N. (2016). Oral inoculation of neonatal Suffolk sheep with the agent of classical scrapie results in PrP(Sc) accumulation in sheep with the PRNP ARQ/ARQ but not the ARQ/ARR genotype. *Res Vet Sci*, *105*, 188-191. https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.02.016

Greenlee, J. J., Zhang, X., Nicholson, E. M., Kunkle, R. A., & Hamir, A. N. (2012). Prolonged incubation time in sheep with prion protein containing lysine at position 171. *J Vet Diagn Invest*, *24*(3), 554-558. https://doi.org/10.1177/1040638712440993

Griffioen, K., Mattson, M. P., & Okun, E. (2018). Deficiency of Toll-like receptors 2, 3 or 4 extends life expectancy in Huntington's disease mice. *Heliyon*, *4*(1), e00508. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00508

Griffith, J. S. (1967). Self-replication and scrapie. *Nature*, *215*(5105), 1043-1044. https://doi.org/10.1038/2151043a0

Groschup, M. H., & Buschmann, A. (2008). Rodent models for prion diseases. *Vet Res*, *39*(4), 32. https://doi.org/10.1051/vetres:2008008

Groveman, B. R., Dolan, M. A., Taubner, L. M., Kraus, A., Wickner, R. B., & Caughey, B. (2014). Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids. *J Biol Chem*, *289*(35), 24129-24142. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.578344

Halleraker, M., Press, C. M., & Landsverk, T. (1994). Development and cell phenotypes in primary follicles of foetal sheep lymph nodes. *Cell Tissue Res*, *275*(1), 51-62. https://doi.org/10.1007/BF00305375

Hamelin, L., Lagarde, J., Dorothee, G., Leroy, C., Labit, M., Comley, R. A., de Souza, L. C., Corne, H., Dauphinot, L., Bertoux, M., Dubois, B., Gervais, P., Colliot, O., Potier, M. C., Bottlaender, M., Sarazin, M., & Clinical, I. t. (2016). Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease: a prospective study using 18F-DPA-714 PET imaging. *Brain*, *139*(Pt 4), 1252-1264. https://doi.org/10.1093/brain/aww017

Hamir, A. N., Kunkle, R. A., Greenlee, J. J., & Richt, J. A. (2009). Experimental oral transmission of United States origin scrapie to neonatal sheep. *J Vet Diagn Invest*, *21*(1), 64-68. https://doi.org/10.1177/104063870902100110

Hamir, A. N., Kunkle, R. A., Richt, J. A., Miller, J. M., Cutlip, R. C., & Jenny, A. L. (2005). Experimental transmission of sheep scrapie by intracerebral and oral routes to genetically susceptible Suffolk sheep in the United States. *J Vet Diagn Invest*, *17*(1), 3-9. https://doi.org/10.1177/104063870501700103

Hanani, M., & Verkhratsky, A. (2021). Satellite Glial Cells and Astrocytes, a Comparative Review. *Neurochem Res*, *46*(10), 2525-2537. https://doi.org/10.1007/s11064-021-03255-8

Hanisch, U. K., & Kettenmann, H. (2007). Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, *10*(11), 1387-1394. https://doi.org/10.1038/nn1997

Hansen, D. V., Hanson, J. E., & Sheng, M. (2018). Microglia in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, *217*(2), 459-472. https://doi.org/10.1083/jcb.201709069

Harmeyer, S., Pfaff, E., & Groschup, M. H. (1998). Synthetic peptide vaccines yield monoclonal antibodies to cellular and pathological prion proteins of ruminants. *J Gen Virol*, *79 (Pt 4)*, 937-945. https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-4-937

Hartmann, K., Sepulveda-Falla, D., Rose, I. V. L., Madore, C., Muth, C., Matschke, J., Butovsky, O., Liddelow, S., Glatzel, M., & Krasemann, S. (2019). Complement 3(+)-astrocytes are highly abundant in prion diseases, but their abolishment led to an accelerated disease course and early dysregulation of microglia. *Acta Neuropathol Commun*, *7*(1), 83. https://doi.org/10.1186/s40478-019-0735-1

He, X., Jing, Z., & Cheng, G. (2014). MicroRNAs: new regulators of Toll-like receptor signalling pathways. *Biomed Res Int*, *2014*, 945169. https://doi.org/10.1155/2014/945169

Hedman, C., Lyahyai, J., Filali, H., Marin, B., Serrano, C., Monleon, E., Moreno, B., Zaragoza, P., Badiola, J. J., Martin-Burriel, I., & Bolea, R. (2012). Differential gene expression and apoptosis markers in presymptomatic scrapie affected sheep. *Vet Microbiol*, *159*(1-2), 23-32. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.03.020

Heesters, B. A., van Megesen, K., Tomris, I., de Vries, R. P., Magri, G., & Spits, H. (2021). Characterization of human FDCs reveals regulation of T cells and antigen presentation to B cells. *J Exp Med*, *218*(10). https://doi.org/10.1084/jem.20210790

Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, *83*(Pt 2), 479-489. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-479

Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Inge Lie, K., Tranulis, M. A., Ulvund, M., Groschup, M. H., & Landsverk, T. (2000). Distribution of prion protein in the ileal Peyer's patch of scrapie-free lambs and lambs naturally and experimentally exposed to the scrapie agent. *J Gen Virol*, *81*(Pt 9), 2327-2337. https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-9-2327

Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Ulvund, M. J., Tranulis, M. A., & Lsverk, T. (2003). Detection of PrPSc in lymphoid tissues of lambs experimentally exposed to the scrapie agent. *J Comp Pathol*, *128*(2-3), 172-181. https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0625

Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nat Rev Immunol*, *14*(7), 463-477. https://doi.org/10.1038/nri3705

Heppner, F. L., Christ, A. D., Klein, M. A., Prinz, M., Fried, M., Kraehenbuhl, J. P., & Aguzzi, A. (2001). Transepithelial prion transport by M cells. *Nat Med*, *7*(9), 976-977. https://doi.org/10.1038/nm0901-976

Herculano-Houzel, S. (2014). The glia/neuron ratio: how it varies uniformly across brain structures and species and what that means for brain physiology and evolution. *Glia*, *62*(9), 1377-1391. https://doi.org/10.1002/glia.22683

Herrera-Rivero, M., Santarelli, F., Brosseron, F., Kummer, M. P., & Heneka, M. T. (2019). Dysregulation of TLR5 and TAM Ligands in the Alzheimer's Brain as Contributors to Disease Progression. *Mol Neurobiol*, *56*(9), 6539-6550. https://doi.org/10.1007/s12035-019-1540-3

Herrmann, L. M., Cheevers, W. P., Davis, W. C., Knowles, D. P., & O'Rourke, K. I. (2003). CD21-positive follicular dendritic cells: A possible source of PrPSc in lymph node macrophages of scrapie-infected sheep. *Am J Pathol*, *162*(4), 1075-1081. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63904-1

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*(20), 5435-5445. https://doi.org/10.1093/emboj/cdg537

Hickman, S., Izzy, S., Sen, P., Morsett, L., & El Khoury, J. (2018). Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci*, *21*(10), 1359-1369. https://doi.org/10.1038/s41593-018-0242-x

Hill, A. F., Will, R. G., Ironside, J., & Collinge, J. (1997). Type of prion protein in UK farmers with Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet*, *350*(9072), 188. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)62356-2

Hilton, D. A., Conyers, L., Edwards, P., Penney, M., Hegazy, D., Ghani, A. C., McCardle, L., Ritchie, D., & Ironside, J. W. (2004). Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples [Article]. *Journal of Pathology*, *203*(3), 733-739. https://doi.org/10.1002/path.1580

Hilton, K. J., Cunningham, C., Reynolds, R. A., & Perry, V. H. (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. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068062

Hipp, M. M., Shepherd, D., Gileadi, U., Aichinger, M. C., Kessler, B. M., Edelmann, M. J., Essalmani, R., Seidah, N. G., Reis e Sousa, C., & Cerundolo, V. (2013). Processing of human toll-like receptor 7 by furin-like proprotein convertases is required for its accumulation and activity in endosomes. *Immunity*, *39*(4), 711-721. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.004

Holloway, O. G., Canty, A. J., King, A. E., & Ziebell, J. M. (2019). Rod microglia and their role in neurological diseases. *Semin Cell Dev Biol*, *94*, 96-103. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.02.005

Horiuchi, M., Yamazaki, N., Ikeda, T., Ishiguro, N., & Shinagawa, M. (1995). A cellular form of prion protein (PrPC) exists in many non-neuronal tissues of sheep. *J Gen Virol*, *76 (Pt 10)*, 2583-2587. https://doi.org/10.1099/0022-1317-76-10-2583

Houston, F., Goldmann, W., Foster, J., Gonzalez, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2015). Comparative Susceptibility of Sheep of Different Origins, Breeds and PRNP Genotypes to Challenge with Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie. *PLoS One*, *10*(11), e0143251. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143251

Houston, F., McCutcheon, S., Goldmann, W., Chong, A., Foster, J., Siso, S., Gonzalez, L., Jeffrey, M., & Hunter, N. (2008). Prion diseases are efficiently transmitted by blood transfusion in sheep. *Blood*, *112*(12), 4739-4745. https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-152520

Hsiao, K., Baker, H. F., Crow, T. J., Poulter, M., Owen, F., Terwilliger, J. D., Westaway, D., Ott, J., & Prusiner, S. B. (1989). Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome. *Nature*, *338*(6213), 342-345. https://doi.org/10.1038/338342a0

Hua, F., Tang, H., Wang, J., Prunty, M. C., Hua, X., Sayeed, I., & Stein, D. G. (2015). TAK-242, an antagonist for Toll-like receptor 4, protects against acute cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, *35*(4), 536-542. https://doi.org/10.1038/jcbfm.2014.240

Huang, F. P., Farquhar, C. F., Mabbott, N. A., Bruce, M. E., & MacPherson, G. G. (2002). Migrating intestinal dendritic cells transport PrP(Sc) from the gut. *J Gen Virol*, *83*(Pt 1), 267-271. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-1-267

Hug, H., Mohajeri, M. H., & La Fata, G. (2018). Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/nu10020203

Huhta, H., Helminen, O., Kauppila, J. H., Salo, T., Porvari, K., Saarnio, J., Lehenkari, P. P., & Karttunen, T. J. (2016). The Expression of Toll-like Receptors in Normal Human and Murine Gastrointestinal Organs and the Effect of Microbiome and Cancer. *J Histochem Cytochem*, *64*(8), 470-482. https://doi.org/10.1369/0022155416656154

Hunter, N. (1997). PrP genetics in sheep and the applications for scrapie and BSE. *Trends Microbiol*, *5*(8), 331-334. https://doi.org/10.1016/s0966-842x(97)01081-0

Hunter, N., Foster, J., Chong, A., McCutcheon, S., Parnham, D., Eaton, S., MacKenzie, C., & Houston, F. (2002). Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol*, *83*(Pt 11), 2897-2905. https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-11-2897

Husebye, H., Halaas, O., Stenmark, H., Tunheim, G., Sandanger, O., Bogen, B., Brech, A., Latz, E., & Espevik, T. (2006). Endocytic pathways regulate Toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J*, *25*(4), 683-692. https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600991

Hwang, I. Y., Park, C., Harrison, K., & Kehrl, J. H. (2009). TLR4 signaling augments B lymphocyte migration and overcomes the restriction that limits access to germinal center dark zones. *J Exp Med*, *206*(12), 2641-2657. https://doi.org/10.1084/jem.20091982

Ifuku, M., Hinkelmann, L., Kuhrt, L. D., Efe, I. E., Kumbol, V., Buonfiglioli, A., Kruger, C., Jordan, P., Fulde, M., Noda, M., Kettenmann, H., & Lehnardt, S. (2020). Activation of Toll-like receptor 5 in microglia modulates their function and triggers neuronal injury. *Acta Neuropathol Commun*, *8*(1), 159. https://doi.org/10.1186/s40478-020-01031-3

Iiyama, R., Kanai, T., Uraushihara, K., Ishikura, T., Makita, S., Totsuka, T., Yamazaki, M., Nakamura, T., Miyata, T., Yoshida, H., Takeuchi, O., Hoshino, K., Takeda, K., Ishikawa, H., Akira, S., & Watanabe, M. (2003). Normal development of the gut-associated lymphoid tissue except Peyer's patch in MyD88-deficient mice. *Scand J Immunol*, *58*(6), 620-627. https://doi.org/10.1111/j.1365-3083.2003.01346.x

Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of animal prion diseases. *Virol J*, *8*, 493. https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-493

Iribarren, P., Chen, K., Hu, J., Gong, W., Cho, E. H., Lockett, S., Uranchimeg, B., & Wang, J. M. (2005). CpG-containing oligodeoxynucleotide promotes microglial cell uptake of amyloid beta 1-42 peptide by up-regulating the expression of the G-protein- coupled receptor mFPR2. *FASEB J*, *19*(14), 2032-2034. https://doi.org/10.1096/fj.05-4578fje

Ishibashi, D., Atarashi, R., & Nishida, N. (2012). Protective role of MyD88-independent innate immune responses against prion infection. *Prion*, *6*(5), 443-446. https://doi.org/10.4161/pri.22579

Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y., & Kohsaka, S. (1998). Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Brain Res Mol Brain Res*, *57*(1), 1-9. https://doi.org/10.1016/s0169-328x(98)00040-0

Iwasaki, A., & Kelsall, B. L. (2001). Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol*, *166*(8), 4884-4890. https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.8.4884

Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol*, *5*(10), 987-995. https://doi.org/10.1038/ni1112

Iwasaki, H., & Akashi, K. (2007). Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene*, *26*(47), 6687-6696. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210754

Jana, M., Palencia, C. A., & Pahan, K. (2008). Fibrillar amyloid-beta peptides activate microglia via TLR2: implications for Alzheimer's disease. *J Immunol*, *181*(10), 7254-7262. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.7254

Jang, M. H., Kweon, M. N., Iwatani, K., Yamamoto, M., Terahara, K., Sasakawa, C., Suzuki, T., Nochi, T., Yokota, Y., Rennert, P. D., Hiroi, T., Tamagawa, H., Iijima, H., Kunisawa, J., Yuki, Y., & Kiyono, H. (2004). Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(16), 6110-6115. https://doi.org/10.1073/pnas.0400969101

Jarrett, J. T., & Lansbury, P. T., Jr. (1993). Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell*, *73*(6), 1055-1058. https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90635-4

Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2007). Classical sheep transmissible spongiform encephalopathies: pathogenesis, pathological phenotypes and clinical disease. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *33*(4), 373-394. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2007.00868.x

Jeffrey, M., Gonzalez, L., Espenes, A., Press, C. M., Martin, S., Chaplin, M., Davis, L., Landsverk, T., MacAldowie, C., Eaton, S., & McGovern, G. (2006). Transportation of prion protein across the intestinal mucosa of scrapie-susceptible and scrapie-resistant sheep. *J Pathol*, *209*(1), 4-14. https://doi.org/10.1002/path.1962

Jeffrey, M., Martin, S., & Gonzalez, L. (2003). Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*, *84*(Pt 4), 1033-1046. https://doi.org/10.1099/vir.0.18825-0

Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J., & Jackman, R. (2001). Differential diagnosis of infections with the bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie agents in sheep. *J Comp Pathol*, *125*(4), 271-284. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0499

Jeffrey, M., Martin, S., Thomson, J. R., Dingwall, W. S., Begara-McGorum, I., & Gonzalez, L. (2001). Onset and distribution of tissue prp accumulation in scrapie-affected suffolk sheep as demonstrated by sequential necropsies and tonsillar biopsies. *J Comp Pathol*, *125*(1), 48-57. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0476

Jeffrey, M., McGovern, G., Goodsir, C. M., Brown, K. L., & Bruce, M. E. (2000). Sites of prion protein accumulation in scrapie-infected mouse spleen revealed by immuno-electron microscopy. *J Pathol*, *191*(3), 323-332. https://doi.org/10.1002/1096-9896(200007)191:3<323::AID-PATH629>3.0.CO;2-Z

Jeffrey, M., McGovern, G., Martin, S., Goodsir, C. M., & Brown, K. L. (2000). Cellular and sub-cellular localisation of PrP in the lymphoreticular system of mice and sheep. *Arch Virol Suppl*(16), 23-38. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6308-5_3

Jeffrey, M., Ryder, S., Martin, S., Hawkins, S. A., Terry, L., Berthelin-Baker, C., & Bellworthy, S. J. (2001). Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol*, *124*(4), 280-289. https://doi.org/10.1053/jcpa.2001.0465

Jones, E. M., & Surewicz, W. K. (2005). Fibril conformation as the basis of species- and strain-dependent seeding specificity of mammalian prion amyloids. *Cell*, *121*(1), 63-72. https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.01.034

Jones, R. S., Minogue, A. M., Connor, T. J., & Lynch, M. A. (2013). Amyloid-beta-induced astrocytic phagocytosis is mediated by CD36, CD47 and RAGE. *J Neuroimmune Pharmacol*, *8*(1), 301-311. https://doi.org/10.1007/s11481-012-9427-3

Jung, C., Hugot, J. P., & Barreau, F. (2010). Peyer's Patches: The Immune Sensors of the Intestine. *Int J Inflam*, *2010*, 823710. https://doi.org/10.4061/2010/823710

Kaczmarek, A., Vandenabeele, P., & Krysko, D. V. (2013). Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*, *38*(2), 209-223. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.02.003

Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S., & Medzhitov, R. (2008). TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta. *Nat Immunol*, *9*(4), 361-368. https://doi.org/10.1038/ni1569

Kakimura, J., Kitamura, Y., Takata, K., Umeki, M., Suzuki, S., Shibagaki, K., Taniguchi, T., Nomura, Y., Gebicke-Haerter, P. J., Smith, M. A., Perry, G., & Shimohama, S. (2002). Microglial activation and amyloid-beta clearance induced by exogenous heat-shock proteins. *FASEB J*, *16*(6), 601-603. https://doi.org/10.1096/fj.01-0530fje

Kaneider, N. C., Kaser, A., Dunzendorfer, S., Tilg, H., & Wiedermann, C. J. (2003). Sphingosine kinase-dependent migration of immature dendritic cells in response to neurotoxic prion protein fragment. *J Virol*, *77*(9), 5535-5539. https://doi.org/10.1128/jvi.77.9.5535-5539.2003

Kaneko, M., Sugiyama, N., Sasayama, D., Yamaoka, K., Miyakawa, T., Arima, K., Tsuchiya, K., Hasegawa, K., Washizuka, S., Hanihara, T., Amano, N., & Yagishita, S. (2008). Prion disease causes less severe lesions in human hippocampus than other parts of brain.

Psychiatry Clin Neurosci, *62*(3), 264-270. https://doi.org/10.1111/j.1440-1819.2008.01792.x

Kang, S. G., Kim, C., Cortez, L. M., Carmen Garza, M., Yang, J., Wille, H., Sim, V. L., Westaway, D., McKenzie, D., & Aiken, J. (2016). Toll-like receptor-mediated immune response inhibits prion propagation. *Glia*, *64*(6), 937-951. https://doi.org/10.1002/glia.22973

Kato, H., Fujihashi, K., Kato, R., Dohi, T., Fujihashi, K., Hagiwara, Y., Kataoka, K., Kobayashi, R., & McGhee, J. R. (2003). Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of Peyer's patch cell interactions. *Int Immunol*, *15*(2), 145-158. https://doi.org/10.1093/intimm/dxg011

Katorcha, E., Makarava, N., Savtchenko, R., D'Azzo, A., & Baskakov, I. V. (2014). Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrPSc glycoform and prion infectivity. *PLoS Pathog*, *10*(9), e1004366. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004366

Kawai, T., & Akira, S. (2009). The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*, *21*(4), 317-337. https://doi.org/10.1093/intimm/dxp017

Kawai, T., & Akira, S. (2011). Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, *34*(5), 637-650. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.05.006

Kawasaki, T., & Kawai, T. (2014). Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol*, *5*, 461. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461

Kazlauskaite, J., Young, A., Gardner, C. E., Macpherson, J. V., Venien-Bryan, C., & Pinheiro, T. J. (2005). An unusual soluble beta-turn-rich conformation of prion is involved in fibril formation and toxic to neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *328*(1), 292-305. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.172

Khakpour, S., Wilhelmsen, K., & Hellman, J. (2015). Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun*, *21*(8), 827-846. https://doi.org/10.1177/1753425915606525

Khan, A., & Ahmad, R. (1997). Maternal immunoglobulins transfer and neonatal lamb mortality—A review. *Pak. Vet. J*, *17*, 161-167.

Khaniya, B., Almeida, L., Basu, U., Taniguchi, M., Williams, J. L., Barreda, D. R., Moore, S. S., & Guan, L. L. (2009). Microarray analysis of differentially expressed genes from Peyer's patches of cattle orally challenged with bovine spongiform encephalopathy. *J Toxicol Environ Health A*, *72*(17-18), 1008-1013. https://doi.org/10.1080/15287390903084199

Kim, C., Ho, D. H., Suk, J. E., You, S., Michael, S., Kang, J., Joong Lee, S., Masliah, E., Hwang, D., Lee, H. J., & Lee, S. J. (2013). Neuron-released oligomeric alpha-synuclein is an endogenous agonist of TLR2 for paracrine activation of microglia. *Nat Commun*, *4*, 1562. https://doi.org/10.1038/ncomms2534

Kim, C., Spencer, B., Rockenstein, E., Yamakado, H., Mante, M., Adame, A., Fields, J. A., Masliah, D., Iba, M., Lee, H. J., Rissman, R. A., Lee, S. J., & Masliah, E. (2018). Immunotherapy targeting toll-like receptor 2 alleviates neurodegeneration in models of synucleinopathy by modulating alpha-synuclein transmission and neuroinflammation. *Mol Neurodegener*, *13*(1), 43. https://doi.org/10.1186/s13024-018-0276-2

Kim, S., Kaiser, V., Beier, E., Bechheim, M., Guenthner-Biller, M., Ablasser, A., Berger, M., Endres, S., Hartmann, G., & Hornung, V. (2014). Self-priming determines high type I IFN production by plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, *44*(3), 807-818. https://doi.org/10.1002/eji.201343806

Kimberlin, R. H., Field, H. J., & Walker, C. A. (1983). Pathogenesis of mouse scrapie: evidence for spread of infection from central to peripheral nervous system. *J Gen Virol*, *64 Pt 3*, 713-716. https://doi.org/10.1099/0022-1317-64-3-713

Kimelberg, H. K. (2004). The problem of astrocyte identity. *Neurochem Int*, *45*(2-3), 191-202. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2003.08.015

Kirkwood, J. K., & Cunningham, A. A. (1994). Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec*, *135*(13), 296-303. https://doi.org/10.1136/vr.135.13.296

Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Raeber, A. J., Kalinke, U., Bluethmann, H., Bootz, F., Suter, M., Zinkernagel, R. M., & Aguzzi, A. (1997). A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature*, *390*(6661), 687-690. https://doi.org/10.1038/37789

Klein, M. A., Frigg, R., Raeber, A. J., Flechsig, E., Hegyi, I., Zinkernagel, R. M., Weissmann, C., & Aguzzi, A. (1998). PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nat Med*, *4*(12), 1429-1433. https://doi.org/10.1038/4022

Klein, M. A., Kaeser, P. S., Schwarz, P., Weyd, H., Xenarios, I., Zinkernagel, R. M., Carroll, M. C., Verbeek, J. S., Botto, M., Walport, M. J., Molina, H., Kalinke, U., Acha-Orbea, H., & Aguzzi, A. (2001). Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med*, *7*(4), 488-492. https://doi.org/10.1038/86567

Klohn, P. C., Castro-Seoane, R., & Collinge, J. (2013). Exosome release from infected dendritic cells: a clue for a fast spread of prions in the periphery? *J Infect*, *67*(5), 359-368. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.07.024

Knoop, K. A., Kumar, N., Butler, B. R., Sakthivel, S. K., Taylor, R. T., Nochi, T., Akiba, H., Yagita, H., Kiyono, H., & Williams, I. R. (2009). RANKL is necessary and sufficient to initiate development of antigen-sampling M cells in the intestinal epithelium. *J Immunol*, *183*(9), 5738-5747. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901563

Kocisko, D. A., Come, J. H., Priola, S. A., Chesebro, B., Raymond, G. J., Lansbury, P. T., & Caughey, B. (1994). Cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Nature*, *370*(6489), 471-474. https://doi.org/10.1038/370471a0

Komine, O., Yamashita, H., Fujimori-Tonou, N., Koike, M., Jin, S., Moriwaki, Y., Endo, F., Watanabe, S., Uematsu, S., Akira, S., Uchiyama, Y., Takahashi, R., Misawa, H., & Yamanaka, K. (2018). Innate immune adaptor TRIF deficiency accelerates disease progression of ALS mice with accumulation of aberrantly activated astrocytes. *Cell Death Differ*, *25*(12), 2130-2146. https://doi.org/10.1038/s41418-018-0098-3

Konold, T., Moore, S. J., Bellworthy, S. J., Terry, L. A., Thorne, L., Ramsay, A., Salguero, F. J., Simmons, M. M., & Simmons, H. A. (2013). Evidence of effective scrapie transmission via colostrum and milk in sheep. *BMC Vet Res*, *9*, 99. https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-99

Kordek, R., Nerurkar, V. R., Liberski, P. P., Isaacson, S., Yanagihara, R., & Gajdusek, D. C. (1996). Heightened expression of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 alpha, and glial fibrillary acidic protein in experimental Creutzfeldt-Jakob disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(18), 9754-9758. https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9754

Kouadir, M., Yang, L., Tan, R., Shi, F., Lu, Y., Zhang, S., Yin, X., Zhou, X., & Zhao, D. (2012). CD36 participates in PrP(106-126)-induced activation of microglia. *PLoS One*, *7*(1), e30756. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030756

Kouadir, M., Yang, L., Tu, J., Yin, X., Zhou, X., & Zhao, D. (2011). Comparison of mRNA expression patterns of class B scavenger receptors in BV2 microglia upon exposure to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins. *DNA Cell Biol*, *30*(11), 893-897. https://doi.org/10.1089/dna.2011.1234

Kranich, J., & Krautler, N. J. (2016). How Follicular Dendritic Cells Shape the B-Cell Antigenome. *Front Immunol*, *7*, 225. https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00225

Kranich, J., Krautler, N. J., Falsig, J., Ballmer, B., Li, S., Hutter, G., Schwarz, P., Moos, R., Julius, C., Miele, G., & Aguzzi, A. (2010). Engulfment of cerebral apoptotic bodies controls the course of prion disease in a mouse strain-dependent manner. *J Exp Med*, *207*(10), 2271-2281. https://doi.org/10.1084/jem.20092401

Kranich, J., Krautler, N. J., Heinen, E., Polymenidou, M., Bridel, C., Schildknecht, A., Huber, C., Kosco-Vilbois, M. H., Zinkernagel, R., Miele, G., & Aguzzi, A. (2008). Follicular dendritic

cells control engulfment of apoptotic bodies by secreting Mfge8. *J Exp Med*, *205*(6), 1293-1302. https://doi.org/10.1084/jem.20071019

Krautler, N. J., Kana, V., Kranich, J., Tian, Y., Perera, D., Lemm, D., Schwarz, P., Armulik, A., Browning, J. L., Tallquist, M., Buch, T., Oliveira-Martins, J. B., Zhu, C., Hermann, M., Wagner, U., Brink, R., Heikenwalder, M., & Aguzzi, A. (2012). Follicular dendritic cells emerge from ubiquitous perivascular precursors. *Cell*, *150*(1), 194-206. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.032

Kujala, P., Raymond, C. R., Romeijn, M., Godsave, S. F., van Kasteren, S. I., Wille, H., Prusiner, S. B., Mabbott, N. A., & Peters, P. J. (2011). Prion uptake in the gut: identification of the first uptake and replication sites. *PLoS Pathog*, *7*(12), e1002449. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002449

Kumar, V. (2019). Toll-like receptors in the pathogenesis of neuroinflammation. *J Neuroimmunol*, *332*, 16-30. https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.03.012

Kushwaha, R., Sinha, A., Makarava, N., Molesworth, K., & Baskakov, I. V. (2021). Non-cell autonomous astrocyte-mediated neuronal toxicity in prion diseases. *Acta Neuropathol Commun*, *9*(1), 22. https://doi.org/10.1186/s40478-021-01123-8

Lacroux, C., Simon, S., Benestad, S. L., Maillet, S., Mathey, J., Lugan, S., Corbiere, F., Cassard, H., Costes, P., Bergonier, D., Weisbecker, J. L., Moldal, T., Simmons, H., Lantier, F., Feraudet-Tarisse, C., Morel, N., Schelcher, F., Grassi, J., & Andreoletti, O. (2008). Prions in milk from ewes incubating natural scrapie. *PLoS Pathog*, *4*(12), e1000238. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000238

Ladogana, A., Puopolo, M., Croes, E. A., Budka, H., Jarius, C., Collins, S., Klug, G. M., Sutcliffe, T., Giulivi, A., Alperovitch, A., Delasnerie-Laupretre, N., Brandel, J. P., Poser, S., Kretzschmar, H., Rietveld, I., Mitrova, E., Cuesta Jde, P., Martinez-Martin, P., Glatzel, M., Aguzzi, A., Knight, R., Ward, H., Pocchiari, M., van Duijn, C. M., Will, R. G., & Zerr, I. (2005). Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada. *Neurology*, *64*(9), 1586-1591. https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000160117.56690.B2

Lai, M., Yao, H., Shah, S. Z. A., Wu, W., Wang, D., Zhao, Y., Wang, L., Zhou, X., Zhao, D., & Yang, L. (2018). The NLRP3-Caspase 1 Inflammasome Negatively Regulates Autophagy via TLR4-TRIF in Prion Peptide-Infected Microglia. *Front Aging Neurosci*, *10*, 116. https://doi.org/10.3389/fnagi.2018.00116

Land, W. G. (2020). Use of DAMPs and SAMPs as Therapeutic Targets or Therapeutics: A Note of Caution. *Mol Diagn Ther*, *24*(3), 251-262. https://doi.org/10.1007/s40291-020-00460-z

Lang, T., & Mansell, A. (2007). The negative regulation of Toll-like receptor and associated pathways. *Immunol Cell Biol*, *85*(6), 425-434. https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100094

Langevin, C., Andreoletti, O., Le Dur, A., Laude, H., & Beringue, V. (2011). Marked influence of the route of infection on prion strain apparent phenotype in a scrapie transgenic mouse model. *Neurobiol Dis*, *41*(1), 219-225. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2010.09.010

Lasmezas, C. I., Deslys, J. P., Robain, O., Jaegly, A., Beringue, V., Peyrin, J. M., Fournier, J. G., Hauw, J. J., Rossier, J., & Dormont, D. (1997). Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*, *275*(5298), 402-405. https://doi.org/10.1126/science.275.5298.402

Latarjet, R., Muel, B., Haig, D. A., Clarke, M. C., & Alper, T. (1970). Inactivation of the scrapie agent by near monochromatic ultraviolet light. *Nature*, *227*(5265), 1341-1343. https://doi.org/10.1038/2271341a0

Lawson, L. J., Perry, V. H., Dri, P., & Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, *39*(1), 151-170. https://doi.org/10.1016/0306-4522(90)90229-w

Le Douarin, N., Dulac, C., Dupin, E., & Cameron-Curry, P. (1991). Glial cell lineages in the neural crest. *Glia*, *4*(2), 175-184. https://doi.org/10.1002/glia.440040209

Le Dur, A., Beringue, V., Andreoletti, O., Reine, F., Lai, T. L., Baron, T., Bratberg, B., Vilotte, J. L., Sarradin, P., Benestad, S. L., & Laude, H. (2005). A newly identified type of scrapie agent

can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(44), 16031-16036. https://doi.org/10.1073/pnas.0502296102

Le Dur, A., Lai, T. L., Stinnakre, M. G., Laisne, A., Chenais, N., Rakotobe, S., Passet, B., Reine, F., Soulier, S., Herzog, L., Tilly, G., Rezaei, H., Beringue, V., Vilotte, J. L., & Laude, H. (2017). Divergent prion strain evolution driven by PrP(C) expression level in transgenic mice. *Nat Commun*, *8*, 14170. https://doi.org/10.1038/ncomms14170

Lee, C. C., Avalos, A. M., & Ploegh, H. L. (2012). Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*, *12*(3), 168-179. https://doi.org/10.1038/nri3151

Lee, H. K., & Iwasaki, A. (2007). Innate control of adaptive immunity: dendritic cells and beyond. *Semin Immunol*, *19*(1), 48-55. https://doi.org/10.1016/j.smim.2006.12.001

Lee, J. W., Nam, H., Kim, L. E., Jeon, Y., Min, H., Ha, S., Lee, Y., Kim, S. Y., Lee, S. J., Kim, E. K., & Yu, S. W. (2019). TLR4 (toll-like receptor 4) activation suppresses autophagy through inhibition of FOXO3 and impairs phagocytic capacity of microglia. *Autophagy*, *15*(5), 753-770. https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1556946

Lefrancois, T., Fages, C., Brugere-Picoux, J., & Tardy, M. (1994). Astroglial reactivity in natural scrapie of sheep. *Microb Pathog*, *17*(5), 283-289. https://doi.org/10.1006/mpat.1994.1074

Lehmann, S. M., Kruger, C., Park, B., Derkow, K., Rosenberger, K., Baumgart, J., Trimbuch, T., Eom, G., Hinz, M., Kaul, D., Habbel, P., Kalin, R., Franzoni, E., Rybak, A., Nguyen, D., Veh, R., Ninnemann, O., Peters, O., Nitsch, R., Heppner, F. L., Golenbock, D., Schott, E., Ploegh, H. L., Wulczyn, F. G., & Lehnardt, S. (2012). An unconventional role for miRNA: let-7 activates Toll-like receptor 7 and causes neurodegeneration. *Nat Neurosci*, *15*(6), 827-835. https://doi.org/10.1038/nn.3113

Lehnardt, S., Massillon, L., Follett, P., Jensen, F. E., Ratan, R., Rosenberg, P. A., Volpe, J. J., & Vartanian, T. (2003). Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(14), 8514-8519. https://doi.org/10.1073/pnas.1432609100

Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M., & Hoffmann, J. A. (1996). The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*, *86*(6), 973-983. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80172-5

Letiembre, M., Liu, Y., Walter, S., Hao, W., Pfander, T., Wrede, A., Schulz-Schaeffer, W., & Fassbender, K. (2009). Screening of innate immune receptors in neurodegenerative diseases: a similar pattern. *Neurobiol Aging*, *30*(5), 759-768. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.018

Lezmi, S., Seuberlich, T., Oevermann, A., Baron, T., & Bencsik, A. (2011). Comparison of brain PrPd distribution in ovine BSE and scrapie. *Vet Pathol*, *48*(6), 1101-1108. https://doi.org/10.1177/0300985810395784

Li, B., Chen, M., & Zhu, C. (2021). Neuroinflammation in Prion Disease. *Int J Mol Sci*, *22*(4). https://doi.org/10.3390/ijms22042196

Liberski, P. P. (2012). Historical overview of prion diseases: a view from afar. *Folia Neuropathol*, *50*(1), 1-12. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22505359

Liberski, P. P., & Ironside, J. W. (2004). An outline of the neuropathology of transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases). *Folia Neuropathol*, *42 Suppl B*, 39-58. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16903141

Liddelow, S. A., & Barres, B. A. (2017). Reactive Astrocytes: Production, Function, and Therapeutic Potential. *Immunity*, *46*(6), 957-967. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.06.006

Liddelow, S. A., Guttenplan, K. A., Clarke, L. E., Bennett, F. C., Bohlen, C. J., Schirmer, L., Bennett, M. L., Munch, A. E., Chung, W. S., Peterson, T. C., Wilton, D. K., Frouin, A., Napier, B. A., Panicker, N., Kumar, M., Buckwalter, M. S., Rowitch, D. H., Dawson, V. L., Dawson, T. M., Stevens, B., & Barres, B. A. (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, *541*(7638), 481-487. https://doi.org/10.1038/nature21029

Lier, J., Streit, W. J., & Bechmann, I. (2021). Beyond Activation: Characterizing Microglial Functional Phenotypes. *Cells*, *10*(9). https://doi.org/10.3390/cells10092236

Ligios, C., Cancedda, M. G., Madau, L., Santucciu, C., Maestrale, C., Agrimi, U., Ru, G., & Di Guardo, G. (2006). PrP(Sc) deposition in nervous tissues without lymphoid tissue involvement is frequently found in ARQ/ARQ Sarda breed sheep preclinically affected with natural scrapie. *Arch Virol*, *151*(10), 2007-2020. https://doi.org/10.1007/s00705-006-0759-2

Ligios, C., Jeffrey, M., Ryder, S. J., Bellworthy, S. J., & Simmons, M. M. (2002). Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol*, *127*(1), 45-57. https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0589

Lin, S. C., Lo, Y. C., & Wu, H. (2010). Helical assembly in the MyD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*, *465*(7300), 885-890. https://doi.org/10.1038/nature09121

Linnartz, B., Kopatz, J., Tenner, A. J., & Neumann, H. (2012). Sialic acid on the neuronal glycocalyx prevents complement C1 binding and complement receptor-3-mediated removal by microglia. *J Neurosci*, *32*(3), 946-952. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3830-11.2012

Liu, G., & Zhao, Y. (2007). Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4+ CD25+ T cells. *Immunology*, *122*(2), 149-156. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02651.x

Liu, H.-Y., Hung, Y.-F., Lin, H., Yen, T.-L., & Hsueh, Y.-P. (2017). Tlr 7 Deletion Selectively Ameliorates Spatial Learning but does not Influence Aβ Deposition and Inflammatory Response in an Alzheimer ' s Disease Mouse Model.

Liu, S., Liu, Y., Hao, W., Wolf, L., Kiliaan, A. J., Penke, B., Rube, C. E., Walter, J., Heneka, M. T., Hartmann, T., Menger, M. D., & Fassbender, K. (2012). TLR2 is a primary receptor for Alzheimer's amyloid beta peptide to trigger neuroinflammatory activation. *J Immunol*, *188*(3), 1098-1107. https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101121

Liu, Y., Walter, S., Stagi, M., Cherny, D., Letiembre, M., Schulz-Schaeffer, W., Heine, H., Penke, B., Neumann, H., & Fassbender, K. (2005). LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, *128*(Pt 8), 1778-1789. https://doi.org/10.1093/brain/awh531

Llorens, F., Lopez-Gonzalez, I., Thune, K., Carmona, M., Zafar, S., Andreoletti, O., Zerr, I., & Ferrer, I. (2014). Subtype and regional-specific neuroinflammation in sporadic creutzfeldt-jakob disease. *Front Aging Neurosci*, *6*, 198. https://doi.org/10.3389/fnagi.2014.00198

Lombardi, V. C., & Khaiboullina, S. F. (2014). Plasmacytoid dendritic cells of the gut: relevance to immunity and pathology. *Clin Immunol*, *153*(1), 165-177. https://doi.org/10.1016/j.clim.2014.04.007

Luhr, K. M., Nordstrom, E. K., Low, P., Ljunggren, H. G., Taraboulos, A., & Kristensson, K. (2004). Scrapie protein degradation by cysteine proteases in CD11c+ dendritic cells and GT1-1 neuronal cells. *J Virol*, *78*(9), 4776-4782. https://doi.org/10.1128/jvi.78.9.4776-4782.2004

Luhr, K. M., Wallin, R. P., Ljunggren, H. G., Low, P., Taraboulos, A., & Kristensson, K. (2002). Processing and degradation of exogenous prion protein by CD11c(+) myeloid dendritic cells in vitro. *J Virol*, *76*(23), 12259-12264. https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.12259-12264.2002

Ma, J., Gao, J., Wang, J., & Xie, A. (2019). Prion-Like Mechanisms in Parkinson's Disease. *Front Neurosci*, *13*, 552. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00552

Ma, Y., & Ma, J. (2020). Immunotherapy against Prion Disease. *Pathogens*, *9*(3). https://doi.org/10.3390/pathogens9030216

Mabbott, N. A., & Bradford, B. M. (2015). The Good, the Bad, and the Ugly of Dendritic Cells during Prion Disease. *J Immunol Res*, *2015*, 168574. https://doi.org/10.1155/2015/168574

Mabbott, N. A., & Bruce, M. E. (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*, *82*(Pt 10), 2307-2318. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-10-2307

Mabbott, N. A., & Bruce, M. E. (2002). Follicular dendritic cells as targets for intervention in transmissible spongiform encephalopathies. *Semin Immunol*, *14*(4), 285-293. https://doi.org/10.1016/s1044-5323(02)00061-1

Mabbott, N. A., Bruce, M. E., Botto, M., Walport, M. J., & Pepys, M. B. (2001). Temporary depletion of complement component C3 or genetic deficiency of C1q significantly delays onset of scrapie. *Nat Med*, *7*(4), 485-487. https://doi.org/10.1038/86562

Mabbott, N. A., Donaldson, D. S., Ohno, H., Williams, I. R., & Mahajan, A. (2013). Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol*, *6*(4), 666-677. https://doi.org/10.1038/mi.2013.30

Mabbott, N. A., & MacPherson, G. G. (2006). Prions and their lethal journey to the brain. *Nat Rev Microbiol*, *4*(3), 201-211. https://doi.org/10.1038/nrmicro1346

Mabbott, N. A., Young, J., McConnell, I., & Bruce, M. E. (2003). Follicular dendritic cell dedifferentiation by treatment with an inhibitor of the lymphotoxin pathway dramatically reduces scrapie susceptibility. *J Virol*, *77*(12), 6845-6854. https://doi.org/10.1128/jvi.77.12.6845-6854.2003

Mahakapuge, T. A., Scheerlinck, J. P., Rojas, C. A., Every, A. L., & Hagen, J. (2016). Assessment of reference genes for reliable analysis of gene transcription by RT-qPCR in ovine leukocytes. *Vet Immunol Immunopathol*, *171*, 1-6. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.10.010

Maignien, T., Lasme Zas, C. I., Beringue, V., Dormont, D., & Deslys, J. P. (1999). Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*, *80 (Pt 11)*, 3035-3042. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-11-3035

Maignien, T., Shakweh, M., Calvo, P., Marce, D., Sales, N., Fattal, E., Deslys, J. P., Couvreur, P., & Lasmezas, C. I. (2005). Role of gut macrophages in mice orally contaminated with scrapie or BSE. *Int J Pharm*, *298*(2), 293-304. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.02.042

Majer, A., Medina, S. J., Niu, Y., Abrenica, B., Manguiat, K. J., Frost, K. L., Philipson, C. S., Sorensen, D. L., & Booth, S. A. (2012). Early mechanisms of pathobiology are revealed by transcriptional temporal dynamics in hippocampal CA1 neurons of prion infected mice. *PLoS Pathog*, *8*(11), e1003002. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003002

Makarava, N., Chang, J. C., & Baskakov, I. V. (2020). Region-Specific Sialylation Pattern of Prion Strains Provides Novel Insight into Prion Neurotropism. *Int J Mol Sci*, *21*(3). https://doi.org/10.3390/ijms21030828

Makarava, N., Chang, J. C., Kushwaha, R., & Baskakov, I. V. (2019). Region-Specific Response of Astrocytes to Prion Infection. *Front Neurosci*, *13*, 1048. https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01048

Makarava, N., Chang, J. C., Molesworth, K., & Baskakov, I. V. (2020). Region-specific glial homeostatic signature in prion diseases is replaced by a uniform neuroinflammation signature, common for brain regions and prion strains with different cell tropism. *Neurobiol Dis*, *137*, 104783. https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104783

Makarava, N., Mychko, O., Chang, J. C., Molesworth, K., & Baskakov, I. V. (2021). The degree of astrocyte activation is predictive of the incubation time to prion disease. *Acta Neuropathol Commun*, *9*(1), 87. https://doi.org/10.1186/s40478-021-01192-9

Mallucci, G., Dickinson, A., Linehan, J., Klohn, P. C., Brandner, S., & Collinge, J. (2003). Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis. *Science*, *302*(5646), 871-874. https://doi.org/10.1126/science.1090187

Mallucci, G. R., White, M. D., Farmer, M., Dickinson, A., Khatun, H., Powell, A. D., Brandner, S., Jefferys, J. G., & Collinge, J. (2007). Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice. *Neuron*, *53*(3), 325-335. https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.01.005

Manavalan, B., Basith, S., & Choi, S. (2011). Similar Structures but Different Roles - An Updated Perspective on TLR Structures. *Front Physiol*, *2*, 41. https://doi.org/10.3389/fphys.2011.00041

Manson, J., West, J. D., Thomson, V., McBride, P., Kaufman, M. H., & Hope, J. (1992). The prion protein gene: a role in mouse embryogenesis? *Development*, *115*(1), 117-122. https://doi.org/10.1242/dev.115.1.117

Marijanovic, Z., Caputo, A., Campana, V., & Zurzolo, C. (2009). Identification of an intracellular site of prion conversion. *PLoS Pathog*, *5*(5), e1000426. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000426

Marshall, A., Bradford, B. M., Clarke, A. R., Manson, J. C., & Mabbott, N. A. (2018). Oral Prion Neuroinvasion Occurs Independently of PrP(C) Expression in the Gut Epithelium. *J Virol*, *92*(19). https://doi.org/10.1128/JVI.01010-18

Martinez del Hoyo, G., Lopez-Bravo, M., Metharom, P., Ardavin, C., & Aucouturier, P. (2006). Prion protein expression by mouse dendritic cells is restricted to the nonplasmacytoid subsets and correlates with the maturation state. *J Immunol*, *177*(9), 6137-6142. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6137

Martinez, F. O., & Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, *6*, 13. https://doi.org/10.12703/P6-13

Martini, A. C., Helman, A. M., McCarty, K. L., Lott, I. T., Doran, E., Schmitt, F. A., & Head, E. (2020). Distribution of microglial phenotypes as a function of age and Alzheimer's disease neuropathology in the brains of people with Down syndrome. *Alzheimers Dement (Amst)*, *12*(1), e12113. https://doi.org/10.1002/dad2.12113

Martinsen, T. C., Benestad, S. L., Moldal, T., & Waldum, H. L. (2011). Inhibitors of gastric acid secretion increase the risk of prion infection in mice. *Scand J Gastroenterol*, *46*(12), 1418-1422. https://doi.org/10.3109/00365521.2011.619277

Masullo, C., & Macchi, G. (1997). Resistance of the hippocampus in Creutzfeldt-Jakob disease. *Clin Neuropathol*, *16*(1), 37-44. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020394

Mathiason, C. K., Hayes-Klug, J., Hays, S. A., Powers, J., Osborn, D. A., Dahmes, S. J., Miller, K. V., Warren, R. J., Mason, G. L., Telling, G. C., Young, A. J., & Hoover, E. A. (2010). B cells and platelets harbor prion infectivity in the blood of deer infected with chronic wasting disease. *J Virol*, *84*(10), 5097-5107. https://doi.org/10.1128/JVI.02169-09

Matsunaga, N., Tsuchimori, N., Matsumoto, T., & Ii, M. (2011). TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules. *Mol Pharmacol*, *79*(1), 34-41. https://doi.org/10.1124/mol.110.068064

Matsushima, N., Tanaka, T., Enkhbayar, P., Mikami, T., Taga, M., Yamada, K., & Kuroki, Y. (2007). Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*, *8*, 124. https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-124

Matyash, V., & Kettenmann, H. (2010). Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Res Rev*, *63*(1-2), 2-10. https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2009.12.001

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*(19), 9320-9327. https://doi.org/10.1128/JVI.75.19.9320-9327.2001

McCulloch, L., Brown, K. L., Bradford, B. M., Hopkins, J., Bailey, M., Rajewsky, K., Manson, J. C., & Mabbott, N. A. (2011). Follicular dendritic cell-specific prion protein (PrP) expression alone is sufficient to sustain prion infection in the spleen. *PLoS Pathog*, *7*(12), e1002402. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002402

McDonald, C. L., Hennessy, E., Rubio-Araiz, A., Keogh, B., McCormack, W., McGuirk, P., Reilly, M., & Lynch, M. A. (2016). Inhibiting TLR2 activation attenuates amyloid accumulation and glial activation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav Immun*, *58*, 191-200. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.07.143

McGovern, G., Brown, K. L., Bruce, M. E., & Jeffrey, M. (2004). Murine scrapie infection causes an abnormal germinal centre reaction in the spleen. *J Comp Pathol*, *130*(2-3), 181-194. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2003.11.001

McGovern, G., & Jeffrey, M. (2007). Scrapie-specific pathology of sheep lymphoid tissues. *PLoS One*, *2*(12), e1304. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001304

McGovern, G., Mabbott, N., & Jeffrey, M. (2009). Scrapie affects the maturation cycle and immune complex trapping by follicular dendritic cells in mice. *PLoS One*, *4*(12), e8186. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008186

McGovern, G., Martin, S., Jeffrey, M., Dexter, G., Hawkins, S. A., Bellworthy, S. J., Thurston, L., Algar, L., & Gonzalez, L. (2016). Minimum Effective Dose of Cattle and Sheep BSE for Oral Sheep Infection. *PLoS One*, *11*(3), e0151440. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151440

McKernan, D. P. (2019). Toll-like receptors and immune cell crosstalk in the intestinal epithelium. *AIMS Allergy and Immunology*, *3*(1), 13-31. https://doi.org/10.3934/Allergy.2019.1.13

Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, *449*(7164), 819-826. https://doi.org/10.1038/nature06246

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., & Janeway, C. A., Jr. (1997). A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, *388*(6640), 394-397. https://doi.org/10.1038/41131

Meling, S., Skovgaard, K., Bardsen, K., Helweg Heegaard, P. M., & Ulvund, M. J. (2018). Expression of selected genes isolated from whole blood, liver and obex in lambs with experimental classical scrapie and healthy controls, showing a systemic innate immune response at the clinical end-stage. *BMC Vet Res*, *14*(1), 281. https://doi.org/10.1186/s12917-018-1607-9

Melzi, E., Rocchi, M. S., Entrican, G., Caporale, M., & Palmarini, M. (2018). Immunophenotyping of Sheep Paraffin-Embedded Peripheral Lymph Nodes. *Front Immunol*, *9*, 2892. https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02892

Menzies, M., & Ingham, A. (2006). Identification and expression of Toll-like receptors 1-10 in selected bovine and ovine tissues. *Vet Immunol Immunopathol*, *109*(1-2), 23-30. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2005.06.014

Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, *31*, 563-604. https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-020711-074950

Merz, P. A., Somerville, R. A., Wisniewski, H. M., & Iqbal, K. (1981). Abnormal fibrils from scrapie-infected brain. *Acta Neuropathol*, *54*(1), 63-74. https://doi.org/10.1007/BF00691333

Mikkelsen, H. B., Huizinga, J. D., Larsen, J. O., & Kirkeby, S. (2017). Ionized calcium-binding adaptor molecule 1 positive macrophages and HO-1 up-regulation in intestinal muscularis resident macrophages. *Anat Rec (Hoboken)*, *300*(6), 1114-1122. https://doi.org/10.1002/ar.23517

Miller, S. J. (2018). Astrocyte Heterogeneity in the Adult Central Nervous System. *Front Cell Neurosci*, *12*, 401. https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00401

Mishra, R. S., Basu, S., Gu, Y., Luo, X., Zou, W. Q., Mishra, R., Li, R., Chen, S. G., Gambetti, P., Fujioka, H., & Singh, N. (2004). Protease-resistant human prion protein and ferritin are cotransported across Caco-2 epithelial cells: implications for species barrier in prion uptake from the intestine. *J Neurosci*, *24*(50), 11280-11290. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2864-04.2004

Miyazawa, K., Kanaya, T., Takakura, I., Tanaka, S., Hondo, T., Watanabe, H., Rose, M. T., Kitazawa, H., Yamaguchi, T., Katamine, S., Nishida, N., & Aso, H. (2010). Transcytosis of murine-adapted bovine spongiform encephalopathy agents in an in vitro bovine M cell model. *J Virol*, *84*(23), 12285-12291. https://doi.org/10.1128/JVI.00969-10

Molteni, M., Gemma, S., & Rossetti, C. (2016). The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation. *Mediators Inflamm*, *2016*, 6978936. https://doi.org/10.1155/2016/6978936

Monleon, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., Vargas, M. A., Badiola, J. J., & Acin, C. (2011). An assessment of the efficiency of PrPsc detection in rectal mucosa and third-eyelid biopsies from animals infected with scrapie. *Vet Microbiol*, *147*(3-4), 237-243. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.028

Montrasio, F., Frigg, R., Glatzel, M., Klein, M. A., Mackay, F., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (2000). Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science*, *288*(5469), 1257-1259. https://doi.org/10.1126/science.288.5469.1257

Monzon, M., Hernandez, R. S., Garces, M., Sarasa, R., & Badiola, J. J. (2018). Glial alterations in human prion diseases: A correlative study of astroglia, reactive microglia, protein deposition, and neuropathological lesions. *Medicine (Baltimore)*, *97*(15), e0320. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000010320

Morel, E., Andrieu, T., Casagrande, F., Gauczynski, S., Weiss, S., Grassi, J., Rousset, M., Dormont, D., & Chambaz, J. (2005). Bovine prion is endocytosed by human enterocytes via the 37 kDa/67 kDa laminin receptor. *Am J Pathol*, *167*(4), 1033-1042. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61192-3

Moreno, C. R., Cosseddu, G. M., Schibler, L., Roig, A., Moazami-Goudarzi, K., Andreoletti, O., Eychenne, F., Lajous, D., Schelcher, F., Cribiu, E. P., Laurent, P., Vaiman, D., & Elsen, J. M. (2008). Identification of new quantitative trait Loci (other than the PRNP gene) modulating the scrapie incubation period in sheep. *Genetics*, *179*(1), 723-726. https://doi.org/10.1534/genetics.108.088146

Moreno, C. R., Lantier, F., Lantier, I., Sarradin, P., & Elsen, J. M. (2003). Detection of new quantitative trait Loci for susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies in mice. *Genetics*, *165*(4), 2085-2091. https://doi.org/10.1093/genetics/165.4.2085

Moser, V. A., Uchoa, M. F., & Pike, C. J. (2018). TLR4 inhibitor TAK-242 attenuates the adverse neural effects of diet-induced obesity. *J Neuroinflammation*, *15*(1), 306. https://doi.org/10.1186/s12974-018-1340-0

Moudjou, M., Frobert, Y., Grassi, J., & La Bonnardiere, C. (2001). Cellular prion protein status in sheep: tissue-specific biochemical signatures. *J Gen Virol*, *82*(Pt 8), 2017-2024. https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-8-2017

Myers, R., Cembran, A., & Fernandez-Funez, P. (2020). Insight From Animals Resistant to Prion Diseases: Deciphering the Genotype - Morphotype - Phenotype Code for the Prion Protein. *Front Cell Neurosci*, *14*, 254. https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00254

Nagyoszi, P., Wilhelm, I., Farkas, A. E., Fazakas, C., Dung, N. T., Hasko, J., & Krizbai, I. A. (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int*, *57*(5), 556-564. https://doi.org/10.1016/j.neuint.2010.07.002

Nakato, G., Fukuda, S., Hase, K., Goitsuka, R., Cooper, M. D., & Ohno, H. (2009). New approach for m-cell-specific molecules screening by comprehensive transcriptome analysis. *DNA Res*, *16*(4), 227-235. https://doi.org/10.1093/dnares/dsp013

Neutra, M. R., Frey, A., & Kraehenbuhl, J. P. (1996). Epithelial M cells: gateways for mucosal infection and immunization. *Cell*, *86*(3), 345-348. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80106-3

Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science*, *308*(5726), 1314-1318. https://doi.org/10.1126/science.1110647

Noda, M., & Suzumura, A. (2012). Sweepers in the CNS: Microglial Migration and Phagocytosis in the Alzheimer Disease Pathogenesis. *Int J Alzheimers Dis*, *2012*, 891087. https://doi.org/10.1155/2012/891087

Nordengen, K., Kirsebom, B. E., Henjum, K., Selnes, P., Gisladottir, B., Wettergreen, M., Torsetnes, S. B., Grontvedt, G. R., Waterloo, K. K., Aarsland, D., Nilsson, L. N. G., & Fladby, T. (2019).

Glial activation and inflammation along the Alzheimer's disease continuum. *J Neuroinflammation*, *16*(1), 46. https://doi.org/10.1186/s12974-019-1399-2

O'Neill, L. A., Golenbock, D., & Bowie, A. G. (2013). The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *13*(6), 453-460. https://doi.org/10.1038/nri3446

O'Rourke, K. I., Baszler, T. V., Besser, T. E., Miller, J. M., Cutlip, R. C., Wells, G. A., Ryder, S. J., Parish, S. M., Hamir, A. N., Cockett, N. E., Jenny, A., & Knowles, D. P. (2000). Preclinical diagnosis of scrapie by immunohistochemistry of third eyelid lymphoid tissue. *J Clin Microbiol*, *38*(9), 3254-3259. https://doi.org/10.1128/JCM.38.9.3254-3259.2000

O'Rourke, K. I., Holyoak, G. R., Clark, W. W., Mickelson, J. R., Wang, S., Melco, R. P., Besser, T. E., & Foote, W. C. (1997). PrP genotypes and experimental scrapie in orally inoculated Suffolk sheep in the United States. *J Gen Virol*, *78 (Pt 4)*, 975-978. https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-4-975

O'Rourke, K. I., Huff, T. P., Leathers, C. W., Robinson, M. M., & Gorham, J. R. (1994). SCID mouse spleen does not support scrapie agent replication. *J Gen Virol*, *75 (Pt 6)*, 1511-1514. https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-6-1511

Oberheim, N. A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J. H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J. D., Pilcher, W., Ojemann, J. G., Ransom, B. R., Goldman, S. A., & Nedergaard, M. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci*, *29*(10), 3276-3287. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009

Obst, J., Simon, E., Mancuso, R., & Gomez-Nicola, D. (2017). The Role of Microglia in Prion Diseases: A Paradigm of Functional Diversity. *Front Aging Neurosci*, *9*, 207. https://doi.org/10.3389/fnagi.2017.00207

Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., Barry, R. A., Tempst, P., Teplow, D. B., Hood, L. E., & et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, *40*(4), 735-746. https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90333-2

Ohno, H. (2016). Intestinal M cells. *J Biochem*, *159*(2), 151-160. https://doi.org/10.1093/jb/mvv121

Ohsawa, K., Imai, Y., Kanazawa, H., Sasaki, Y., & Kohsaka, S. (2000). Involvement of Iba1 in membrane ruffling and phagocytosis of macrophages/microglia. *J Cell Sci*, *113 (Pt 17)*, 3073-3084. https://doi.org/10.1242/jcs.113.17.3073

OIE. (2018). *OIE Terrestrial Manual, Chapter 3.7.11., Scrapie*. https://www.woah.org/en/disease/scrapie/

OIE. (2021). *OIE, Capítulo 14.8., Prurigo lumbar*. https://www.woah.org/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/current/chapitre_scrapie.pdf

Otte, J. M., Cario, E., & Podolsky, D. K. (2004). Mechanisms of cross hyporesponsiveness to Toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, *126*(4), 1054-1070. https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.01.007

Palmer, M. S., Dryden, A. J., Hughes, J. T., & Collinge, J. (1991). Homozygous prion protein genotype predisposes to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Nature*, *352*(6333), 340-342. https://doi.org/10.1038/352340a0

Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., Mehlhorn, I., Huang, Z., Fletterick, R. J., Cohen, F. E., & et al. (1993). Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(23), 10962-10966. https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10962

Panaro, M. A., Lofrumento, D. D., Saponaro, C., De Nuccio, F., Cianciulli, A., Mitolo, V., & Nicolardi, G. (2008). Expression of TLR4 and CD14 in the central nervous system (CNS) in a MPTP mouse model of Parkinson's-like disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, *30*(4), 729-740. https://doi.org/10.1080/08923970802278557

Panda, A., Qian, F., Mohanty, S., van Duin, D., Newman, F. K., Zhang, L., Chen, S., Towle, V., Belshe, R. B., Fikrig, E., Allore, H. G., Montgomery, R. R., & Shaw, A. C. (2010). Age-associated

decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *J Immunol*, *184*(5), 2518-2527. https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901022

Pappo, J., & Owen, R. L. (1988). Absence of secretory component expression by epithelial cells overlying rabbit gut-associated lymphoid tissue. *Gastroenterology*, *95*(5), 1173-1177. https://doi.org/10.1016/0016-5085(88)90347-2

Parchi, P., Strammiello, R., Notari, S., Giese, A., Langeveld, J. P., Ladogana, A., Zerr, I., Roncaroli, F., Cras, P., Ghetti, B., Pocchiari, M., Kretzschmar, H., & Capellari, S. (2009). Incidence and spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease variants with mixed phenotype and co-occurrence of PrPSc types: an updated classification. *Acta Neuropathol*, *118*(5), 659-671. https://doi.org/10.1007/s00401-009-0585-1

Park, C. S., & Choi, Y. S. (2005). How do follicular dendritic cells interact intimately with B cells in the germinal centre? *Immunology*, *114*(1), 2-10. https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02075.x

Pasare, C., & Medzhitov, R. (2003). Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, *299*(5609), 1033-1036. https://doi.org/10.1126/science.1078231

Pascale, F., Contreras, V., Bonneau, M., Courbet, A., Chilmonczyk, S., Bevilacqua, C., Epardaud, M., Niborski, V., Riffault, S., Balazuc, A. M., Foulon, E., Guzylack-Piriou, L., Riteau, B., Hope, J., Bertho, N., Charley, B., & Schwartz-Cornil, I. (2008). Plasmacytoid dendritic cells migrate in afferent skin lymph. *J Immunol*, *180*(9), 5963-5972. https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.9.5963

Pattison, I. H. (1965). Resistance of the Scrapie Agent to Formalin. *J Comp Pathol*, *75*, 159-164. https://doi.org/10.1016/0021-9975(65)90006-x

Pattison, I. H. (1966). The relative susceptibility of sheep, goats and mice to two types of the goat scrapie agent. *Res Vet Sci*, *7*(2), 207-212. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4163198

Peggion, C., Stella, R., Lorenzon, P., Spisni, E., Bertoli, A., & Massimino, M. L. (2020). Microglia in Prion Diseases: Angels or Demons? *Int J Mol Sci*, *21*(20). https://doi.org/10.3390/ijms21207765

Pekny, M., & Pekna, M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*, *94*(4), 1077-1098. https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2013

Pelegrin-Valls, J., Serrano-Perez, B., Villalba, D., Martin-Alonso, M. J., Bertolin, J. R., Joy, M., & Alvarez-Rodriguez, J. (2020). Effect of Dietary Crude Protein on Productive Efficiency, Nutrient Digestibility, Blood Metabolites and Gastrointestinal Immune Markers in Light Lambs. *Animals (Basel)*, *10*(2). https://doi.org/10.3390/ani10020328

Perdiguero, E. G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., de Bruijn, M., Rodewald, H. R., & Geissmann, F. (2015). The Origin of Tissue-Resident Macrophages: When an Erythro-myeloid Progenitor Is an Erythro-myeloid Progenitor. *Immunity*, *43*(6), 1023-1024. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.11.022

Phatnani, H., & Maniatis, T. (2015). Astrocytes in neurodegenerative disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *7*(6). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020628

Piccardo, P., Manson, J. C., King, D., Ghetti, B., & Barron, R. M. (2007). Accumulation of prion protein in the brain that is not associated with transmissible disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(11), 4712-4717. https://doi.org/10.1073/pnas.0609241104

Piercey Akesson, C., Press, C. M., Tranulis, M. A., Jeffrey, M., Aleksandersen, M., Landsverk, T., & Espenes, A. (2012). Phenotypic characterization of cells participating in transport of prion protein aggregates across the intestinal mucosa of sheep. *Prion*, *6*(3), 261-275. https://doi.org/10.4161/pri.19215

Porter, D. D., Porter, H. G., & Cox, N. A. (1973). Failure to demonstrate a humoral immune response to scrapie infection in mice. *J Immunol*, *111*(5), 1407-1410. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4200779

Price, A. E., Shamardani, K., Lugo, K. A., Deguine, J., Roberts, A. W., Lee, B. L., & Barton, G. M. (2018). A Map of Toll-like Receptor Expression in the Intestinal Epithelium Reveals Distinct Spatial, Cell Type-Specific, and Temporal Patterns. *Immunity*, *49*(3), 560-575 e566. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.016

Prinz, M., Garbe, F., Schmidt, H., Mildner, A., Gutcher, I., Wolter, K., Piesche, M., Schroers, R., Weiss, E., Kirschning, C. J., Rochford, C. D., Bruck, W., & Becher, B. (2006). Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest*, *116*(2), 456-464. https://doi.org/10.1172/JCI26078

Prinz, M., Heikenwalder, M., Junt, T., Schwarz, P., Glatzel, M., Heppner, F. L., Fu, Y. X., Lipp, M., & Aguzzi, A. (2003). Positioning of follicular dendritic cells within the spleen controls prion neuroinvasion. *Nature*, *425*(6961), 957-962. https://doi.org/10.1038/nature02072

Prinz, M., Huber, G., Macpherson, A. J., Heppner, F. L., Glatzel, M., Eugster, H. P., Wagner, N., & Aguzzi, A. (2003). Oral prion infection requires normal numbers of Peyer's patches but not of enteric lymphocytes. *Am J Pathol*, *162*(4), 1103-1111. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63907-7

Prinz, M., Montrasio, F., Klein, M. A., Schwarz, P., Priller, J., Odermatt, B., Pfeffer, K., & Aguzzi, A. (2002). Lymph nodal prion replication and neuroinvasion in mice devoid of follicular dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(2), 919-924. https://doi.org/10.1073/pnas.022626399

Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144. https://doi.org/10.1126/science.6801762

Prusiner, S. B. (1989). Scrapie prions. *Annu Rev Microbiol*, *43*, 345-374. https://doi.org/10.1146/annurev.mi.43.100189.002021

Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13363-13383. https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13363

Prusiner, S. B. (2013). Biology and genetics of prions causing neurodegeneration. *Annu Rev Genet*, *47*, 601-623. https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155524

Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Bowman, K. A., Bolton, D. C., Bendheim, P. E., Groth, D. F., & Glenner, G. G. (1983). Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods. *Cell*, *35*(2 Pt 1), 349-358. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90168-x

Prusiner, S. B., McKinley, M. P., Groth, D. F., Bowman, K. A., Mock, N. I., Cochran, S. P., & Masiarz, F. R. (1981). Scrapie agent contains a hydrophobic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*(11), 6675-6679. https://doi.org/10.1073/pnas.78.11.6675

Race, R., Oldstone, M., & Chesebro, B. (2000). Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*, *74*(2), 828-833. https://doi.org/10.1128/jvi.74.2.828-833.2000

Raeber, A. J., Klein, M. A., Frigg, R., Flechsig, E., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (1999). PrP-dependent association of prions with splenic but not circulating lymphocytes of scrapie-infected mice. *EMBO J*, *18*(10), 2702-2706. https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2702

Raeber, A. J., Montrasio, F., Hegyi, I., Frigg, R., Klein, M. A., Aguzzi, A., & Weissmann, C. (2001). Studies on prion replication in spleen. *Dev Immunol*, *8*(3-4), 291-304. https://doi.org/10.1155/2001/95404

Raeber, A. J., Race, R. E., Brandner, S., Priola, S. A., Sailer, A., Bessen, R. A., Mucke, L., Manson, J., Aguzzi, A., Oldstone, M. B., Weissmann, C., & Chesebro, B. (1997). Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP knockout mice susceptible to hamster scrapie. *EMBO J*, *16*(20), 6057-6065. https://doi.org/10.1093/emboj/16.20.6057

Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., & Medzhitov, R. (2004). Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, *118*(2), 229-241. https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002

Ramasamy, I., Law, M., Collins, S., & Brooke, F. (2003). Organ distribution of prion proteins in variant Creutzfeldt-Jakob disease. *Lancet Infect Dis*, *3*(4), 214-222. https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00578-4

Rangasamy, S. B., Jana, M., Roy, A., Corbett, G. T., Kundu, M., Chandra, S., Mondal, S., Dasarathi, S., Mufson, E. J., Mishra, R. K., Luan, C. H., Bennett, D. A., & Pahan, K. (2018). Selective disruption of TLR2-MyD88 interaction inhibits inflammation and attenuates Alzheimer's pathology. *J Clin Invest*, *128*(10), 4297-4312. https://doi.org/10.1172/JCI96209

Ransohoff, R. M. (2016). How neuroinflammation contributes to neurodegeneration. *Science*, *353*(6301), 777-783. https://doi.org/10.1126/science.aag2590

Raskin, J., Cummings, J., Hardy, J., Schuh, K., & Dean, R. A. (2015). Neurobiology of Alzheimer's Disease: Integrated Molecular, Physiological, Anatomical, Biomarker, and Cognitive Dimensions. *Curr Alzheimer Res*, *12*(8), 712-722. https://doi.org/10.2174/1567205012666150701103107

Rawlings, D. J., Schwartz, M. A., Jackson, S. W., & Meyer-Bahlburg, A. (2012). Integration of B cell responses through Toll-like receptors and antigen receptors. *Nat Rev Immunol*, *12*(4), 282-294. https://doi.org/10.1038/nri3190

Raymond, C. R., Aucouturier, P., & Mabbott, N. A. (2007). In vivo depletion of CD11c+ cells impairs scrapie agent neuroinvasion from the intestine. *J Immunol*, *179*(11), 7758-7766. https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7758

Reed-Geaghan, E. G., Savage, J. C., Hise, A. G., & Landreth, G. E. (2009). CD14 and toll-like receptors 2 and 4 are required for fibrillar A{beta}-stimulated microglial activation. *J Neurosci*, *29*(38), 11982-11992. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3158-09.2009

Rehli, M. (2002). Of mice and men: species variations of Toll-like receptor expression. *Trends Immunol*, *23*(8), 375-378. https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02259-7

Reizis, B. (2019). Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function. *Immunity*, *50*(1), 37-50. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.12.027

Ren, Y., Silverstein, R. L., Allen, J., & Savill, J. (1995). CD36 gene transfer confers capacity for phagocytosis of cells undergoing apoptosis. *J Exp Med*, *181*(5), 1857-1862. https://doi.org/10.1084/jem.181.5.1857

Rescigno, M., Urbano, M., Valzasina, B., Francolini, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J. P., & Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, *2*(4), 361-367. https://doi.org/10.1038/86373

Reynaud, C. A., Mackay, C. R., Muller, R. G., & Weill, J. C. (1991). Somatic generation of diversity in a mammalian primary lymphoid organ: the sheep ileal Peyer's patches. *Cell*, *64*(5), 995-1005. https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90323-q

Reynolds, J. D., & Morris, B. (1983). The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur J Immunol*, *13*(8), 627-635. https://doi.org/10.1002/eji.1830130805

Reynolds, J. M., & Dong, C. (2013). Toll-like receptor regulation of effector T lymphocyte function. *Trends Immunol*, *34*(10), 511-519. https://doi.org/10.1016/j.it.2013.06.003

Rezk, S. A., Nathwani, B. N., Zhao, X., & Weiss, L. M. (2013). Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Hum Pathol*, *44*(6), 937-950. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.10.005

Richard, K. L., Filali, M., Prefontaine, P., & Rivest, S. (2008). Toll-like receptor 2 acts as a natural innate immune receptor to clear amyloid beta 1-42 and delay the cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, *28*(22), 5784-5793. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1146-08.2008

Riek, R., Hornemann, S., Wider, G., Billeter, M., Glockshuber, R., & Wuthrich, K. (1996). NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-231). *Nature*, *382*(6587), 180-182. https://doi.org/10.1038/382180a0

Rivera, N. A., Brandt, A. L., Novakofski, J. E., & Mateus-Pinilla, N. E. (2019). Chronic Wasting Disease In Cervids: Prevalence, Impact And Management Strategies. *Vet Med (Auckl)*, *10*, 123-139. https://doi.org/10.2147/VMRR.S197404

Rodrigues, P. F., Alberti-Servera, L., Eremin, A., Grajales-Reyes, G. E., Ivanek, R., & Tussiwand, R. (2018). Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells. *Nat Immunol*, *19*(7), 711-722. https://doi.org/10.1038/s41590-018-0136-9

Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*, *18*(4), e27. https://doi.org/10.4110/in.2018.18.e27

Romero-Palomo, F., Risalde, M. A., Molina, V., Sanchez-Cordon, P. J., Pedrera, M., & Gomez-Villamandos, J. C. (2013). Immunohistochemical detection of dendritic cell markers in cattle. *Vet Pathol*, *50*(6), 1099-1108. https://doi.org/10.1177/0300985813482951

Rosenberger, K., Derkow, K., Dembny, P., Kruger, C., Schott, E., & Lehnardt, S. (2014). The impact of single and pairwise Toll-like receptor activation on neuroinflammation and neurodegeneration. *J Neuroinflammation*, *11*, 166. https://doi.org/10.1186/s12974-014-0166-7

Rosset, M. B., Ballerini, C., Gregoire, S., Metharom, P., Carnaud, C., & Aucouturier, P. (2004). Breaking immune tolerance to the prion protein using prion protein peptides plus oligodeoxynucleotide-CpG in mice. *J Immunol*, *172*(9), 5168-5174. https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.9.5168

Roszer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm*, *2015*, 816460. https://doi.org/10.1155/2015/816460

Rowitch, D. H., & Kriegstein, A. R. (2010). Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*, *468*(7321), 214-222. https://doi.org/10.1038/nature09611

Ruiz-Campillo, M. T., Molina-Hernandez, V., Bautista, M. J., Pacheco, I. L., Zafra, R., Buffoni, L., Martinez-Moreno, F. J., Martinez-Moreno, A., & Perez, J. (2020). Characterization of dendritic cells and follicular dendritic cells in the hepatic lymph nodes and liver of sheep experimentally infected with Fasciola hepatica. *Vet Res*, *51*(1), 33. https://doi.org/10.1186/s13567-020-00757-1

Rumio, C., Besusso, D., Arnaboldi, F., Palazzo, M., Selleri, S., Gariboldi, S., Akira, S., Uematsu, S., Bignami, P., Ceriani, V., Menard, S., & Balsari, A. (2006). Activation of smooth muscle and myenteric plexus cells of jejunum via Toll-like receptor 4. *J Cell Physiol*, *208*(1), 47-54. https://doi.org/10.1002/jcp.20632

Russell Greig, J. (1940). Observations on the Transmission of the Disease by Mediate Contact [Article]. *Veterinary Journal, The (1900)*, *96*(5), 203-206. https://doi.org/10.1016/S0372-5545(17)35058-7

Rybner-Barnier, C., Jacquemot, C., Cuche, C., Dore, G., Majlessi, L., Gabellec, M. M., Moris, A., Schwartz, O., Di Santo, J., Cumano, A., Leclerc, C., & Lazarini, F. (2006). Processing of the bovine spongiform encephalopathy-specific prion protein by dendritic cells. *J Virol*, *80*(10), 4656-4663. https://doi.org/10.1128/JVI.80.10.4656-4663.2006

Ryder, S. J., Dexter, G. E., Heasman, L., Warner, R., & Moore, S. J. (2009). Accumulation and dissemination of prion protein in experimental sheep scrapie in the natural host. *BMC Vet Res*, *5*, 9. https://doi.org/10.1186/1746-6148-5-9

Saba, R., Gushue, S., Huzarewich, R. L., Manguiat, K., Medina, S., Robertson, C., & Booth, S. A. (2012). MicroRNA 146a (miR-146a) is over-expressed during prion disease and modulates the innate immune response and the microglial activation state. *PLoS One*, *7*(2), e30832. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030832

Sabroe, I., Jones, E. C., Usher, L. R., Whyte, M. K., & Dower, S. K. (2002). Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol*, *168*(9), 4701-4710. https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.9.4701

Saenz, R., Futalan, D., Leutenez, L., Eekhout, F., Fecteau, J. F., Sundelius, S., Sundqvist, S., Larsson, M., Hayashi, T., Minev, B., Carson, D., Esener, S., Messmer, B., & Messmer, D. (2014). TLR4-dependent activation of dendritic cells by an HMGB1-derived peptide adjuvant. *J Transl Med*, *12*, 211. https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-211

Safar, J. G., Lessard, P., Tamguney, G., Freyman, Y., Deering, C., Letessier, F., Dearmond, S. J., & Prusiner, S. B. (2008). Transmission and detection of prions in feces. *J Infect Dis*, *198*(1), 81-89. https://doi.org/10.1086/588193

Sakai, K., Hasebe, R., Takahashi, Y., Song, C. H., Suzuki, A., Yamasaki, T., & Horiuchi, M. (2013). Absence of CD14 delays progression of prion diseases accompanied by increased microglial activation. *J Virol*, *87*(24), 13433-13445. https://doi.org/10.1128/JVI.02072-13

Sandberg, M. K., Al-Doujaily, H., Sharps, B., De Oliveira, M. W., Schmidt, C., Richard-Londt, A., Lyall, S., Linehan, J. M., Brandner, S., Wadsworth, J. D., Clarke, A. R., & Collinge, J. (2014). Prion neuropathology follows the accumulation of alternate prion protein isoforms after infective titre has peaked. *Nat Commun*, *5*, 4347. https://doi.org/10.1038/ncomms5347

Sarasa, R., Martinez, A., Monleon, E., Bolea, R., Vargas, A., Badiola, J. J., & Monzon, M. (2012). Involvement of astrocytes in transmissible spongiform encephalopathies: a confocal microscopy study. *Cell Tissue Res*, *350*(1), 127-134. https://doi.org/10.1007/s00441-012-1461-1

Sassa, Y., Inoshima, Y., & Ishiguro, N. (2010). Bovine macrophage degradation of scrapie and BSE PrPSc. *Vet Immunol Immunopathol*, *133*(1), 33-39. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2009.06.018

Sassa, Y., Yamasaki, T., Horiuchi, M., Inoshima, Y., & Ishiguro, N. (2010). The effects of lysosomal and proteasomal inhibitors on abnormal forms of prion protein degradation in murine macrophages. *Microbiol Immunol*, *54*(12), 763-768. https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2010.00272.x

Sato, K., & Fujita, S. (2007). Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int*, *56*(3), 183-191. https://doi.org/10.2332/allergolint.R-06-139

Satpathy, A. T., Wu, X., Albring, J. C., & Murphy, K. M. (2012). Re(de)fining the dendritic cell lineage. *Nat Immunol*, *13*(12), 1145-1154. https://doi.org/10.1038/ni.2467

Saunders, G. C., Cawthraw, S., Mountjoy, S. J., Hope, J., & Windl, O. (2006). PrP genotypes of atypical scrapie cases in Great Britain. *J Gen Virol*, *87*(Pt 11), 3141-3149. https://doi.org/10.1099/vir.0.81779-0

Schmitz, F., Mages, J., Heit, A., Lang, R., & Wagner, H. (2004). Transcriptional activation induced in macrophages by Toll-like receptor (TLR) ligands: from expression profiling to a model of TLR signaling. *Eur J Immunol*, *34*(10), 2863-2873. https://doi.org/10.1002/eji.200425228

Schneider, K., Fangerau, H., Michaelsen, B., & Raab, W. H. (2008). The early history of the transmissible spongiform encephalopathies exemplified by scrapie. *Brain Res Bull*, *77*(6), 343-355. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2008.09.012

Scholtzova, H., Chianchiano, P., Pan, J., Sun, Y., Goni, F., Mehta, P. D., & Wisniewski, T. (2014). Amyloid beta and Tau Alzheimer's disease related pathology is reduced by Toll-like receptor 9 stimulation. *Acta Neuropathol Commun*, *2*, 101. https://doi.org/10.1186/s40478-014-0101-2

Schreuder, B. E., van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (1998). Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie. *Vet Rec*, *142*(21), 564-568. https://doi.org/10.1136/vr.142.21.564

Selariu, A., Powers, J. G., Nalls, A., Brandhuber, M., Mayfield, A., Fullaway, S., Wyckoff, C. A., Goldmann, W., Zabel, M. M., Wild, M. A., Hoover, E. A., & Mathiason, C. K. (2015). In utero transmission and tissue distribution of chronic wasting disease-associated prions in free-ranging Rocky Mountain elk. *J Gen Virol*, *96*(11), 3444-3455. https://doi.org/10.1099/jgv.0.000281

Sethi, S., Lipford, G., Wagner, H., & Kretzschmar, H. (2002). Postexposure prophylaxis against prion disease with a stimulator of innate immunity. *Lancet*, *360*(9328), 229-230. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09513-2

Shahidehpour, R. K., Higdon, R. E., Crawford, N. G., Neltner, J. H., Ighodaro, E. T., Patel, E., Price, D., Nelson, P. T., & Bachstetter, A. D. (2021). Dystrophic microglia are associated with neurodegenerative disease and not healthy aging in the human brain. *Neurobiol Aging*, *99*, 19-27. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2020.12.003

Sham, H. P., Yu, E. Y., Gulen, M. F., Bhinder, G., Stahl, M., Chan, J. M., Brewster, L., Morampudi, V., Gibson, D. L., Hughes, M. R., McNagny, K. M., Li, X., & Vallance, B. A. (2013). SIGIRR, a negative regulator of TLR/IL-1R signalling promotes Microbiota dependent resistance to colonization by enteric bacterial pathogens. *PLoS Pathog*, *9*(8), e1003539. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003539

Shapouri-Moghaddam, A., Mohammadian, S., Vazini, H., Taghadosi, M., Esmaeili, S. A., Mardani, F., Seifi, B., Mohammadi, A., Afshari, J. T., & Sahebkar, A. (2018). Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, *233*(9), 6425-6440. https://doi.org/10.1002/jcp.26429

Shaw, A. C., Panda, A., Joshi, S. R., Qian, F., Allore, H. G., & Montgomery, R. R. (2011). Dysregulation of human Toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev*, *10*(3), 346-353. https://doi.org/10.1016/j.arr.2010.10.007

Shigetomi, E., Patel, S., & Khakh, B. S. (2016). Probing the Complexities of Astrocyte Calcium Signaling. *Trends Cell Biol*, *26*(4), 300-312. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.01.003

Shim, S. Y., Karri, S., Law, S., Schatzl, H. M., & Gilch, S. (2016). Prion infection impairs lysosomal degradation capacity by interfering with rab7 membrane attachment in neuronal cells. *Sci Rep*, *6*, 21658. https://doi.org/10.1038/srep21658

Shmuel-Galia, L., Klug, Y., Porat, Z., Charni, M., Zarmi, B., & Shai, Y. (2017). Intramembrane attenuation of the TLR4-TLR6 dimer impairs receptor assembly and reduces microglia-mediated neurodegeneration. *J Biol Chem*, *292*(32), 13415-13427. https://doi.org/10.1074/jbc.M117.784983

Sierra, A., de Castro, F., Del Rio-Hortega, J., Rafael Iglesias-Rozas, J., Garrosa, M., & Kettenmann, H. (2016). The "Big-Bang" for modern glial biology: Translation and comments on Pio del Rio-Hortega 1919 series of papers on microglia. *Glia*, *64*(11), 1801-1840. https://doi.org/10.1002/glia.23046

Sigurdson, C. J., & Miller, M. W. (2003). Other animal prion diseases. *Br Med Bull*, *66*, 199-212. https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.199

Sigurdson, C. J., Williams, E. S., Miller, M. W., Spraker, T. R., O'Rourke, K. I., & Hoover, E. A. (1999). Oral transmission and early lymphoid tropism of chronic wasting disease PrPres in mule deer fawns (Odocoileus hemionus). *J Gen Virol*, *80 (Pt 10)*, 2757-2764. https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-10-2757

Silva, C. J., Vazquez-Fernandez, E., Onisko, B., & Requena, J. R. (2015). Proteinase K and the structure of PrPSc: The good, the bad and the ugly. *Virus Res*, *207*, 120-126. https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.008

Silveira, J. R., Raymond, G. J., Hughson, A. G., Race, R. E., Sim, V. L., Hayes, S. F., & Caughey, B. (2005). The most infectious prion protein particles. *Nature*, *437*(7056), 257-261. https://doi.org/10.1038/nature03989

Silverstein, R. L., & Febbraio, M. (2009). CD36, a scavenger receptor involved in immunity, metabolism, angiogenesis, and behavior. *Sci Signal*, *2*(72), re3. https://doi.org/10.1126/scisignal.272re3

Sinha, A., Kushwaha, R., Molesworth, K., Mychko, O., Makarava, N., & Baskakov, I. V. (2021). Phagocytic Activities of Reactive Microglia and Astrocytes Associated with Prion Diseases Are Dysregulated in Opposite Directions. *Cells*, *10*(7). https://doi.org/10.3390/cells10071728

Siso, S., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2010). Neuroinvasion in prion diseases: the roles of ascending neural infection and blood dissemination. *Interdiscip Perspect Infect Dis*, *2010*, 747892. https://doi.org/10.1155/2010/747892

Siso, S., Jeffrey, M., & Gonzalez, L. (2009). Neuroinvasion in sheep transmissible spongiform encephalopathies: the role of the haematogenous route. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *35*(3), 232-246. https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2008.00978.x

Skretting, G., Espenes, A., Ulvund, M. J., & Olsaker, I. (2004). cDNA representational difference analysis of ileal Peyer's patches in lambs after oral inoculation with scrapie. *Biochem Biophys Res Commun*, *316*(1), 272-279. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.040

Smith, J. P., Burton, G. F., Tew, J. G., & Szakal, A. K. (1998). Tingible body macrophages in regulation of germinal center reactions. *Dev Immunol*, *6*(3-4), 285-294. https://doi.org/10.1155/1998/38923

Smith, M. W. (1985). Selective expression of brush border hydrolases by mouse Peyer's patch and jejunal villus enterocytes. *J Cell Physiol*, *124*(2), 219-225. https://doi.org/10.1002/jcp.1041240208

Snoeck, V., Goddeeris, B., & Cox, E. (2005). The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect*, *7*(7-8), 997-1004. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2005.04.003

Sofroniew, M. V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, *32*(12), 638-647. https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.08.002

Sohn, H. J., Kim, J. H., Choi, K. S., Nah, J. J., Joo, Y. S., Jean, Y. H., Ahn, S. W., Kim, O. K., Kim, D. Y., & Balachandran, A. (2002). A case of chronic wasting disease in an elk imported to Korea from Canada. *J Vet Med Sci*, *64*(9), 855-858. https://doi.org/10.1292/jvms.64.855

Sorby, R., Austbo, L., Press, C. M., Skretting, G., Landsverk, T., & Espenes, A. (2009). PrP expression, PrPSc accumulation and innervation of splenic compartments in sheep experimentally infected with scrapie. *PLoS One*, *4*(9), e6885. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006885

Spillantini, M. G., Schmidt, M. L., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., Jakes, R., & Goedert, M. (1997). Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature*, *388*(6645), 839-840. https://doi.org/10.1038/42166

Spinner, D. S., Cho, I. S., Park, S. Y., Kim, J. I., Meeker, H. C., Ye, X., Lafauci, G., Kerr, D. J., Flory, M. J., Kim, B. S., Kascsak, R. B., Wisniewski, T., Levis, W. R., Schuller-Levis, G. B., Carp, R. I., Park, E., & Kascsak, R. J. (2008). Accelerated prion disease pathogenesis in Toll-like receptor 4 signaling-mutant mice. *J Virol*, *82*(21), 10701-10708. https://doi.org/10.1128/JVI.00522-08

Spinner, D. S., Kascsak, R. B., Lafauci, G., Meeker, H. C., Ye, X., Flory, M. J., Kim, J. I., Schuller-Levis, G. B., Levis, W. R., Wisniewski, T., Carp, R. I., & Kascsak, R. J. (2007). CpG oligodeoxynucleotide-enhanced humoral immune response and production of antibodies to prion protein PrPSc in mice immunized with 139A scrapie-associated fibrils. *J Leukoc Biol*, *81*(6), 1374-1385. https://doi.org/10.1189/jlb.1106665

Srivastava, S., Katorcha, E., Makarava, N., Barrett, J. P., Loane, D. J., & Baskakov, I. V. (2018). Inflammatory response of microglia to prions is controlled by sialylation of PrP(Sc). *Sci Rep*, *8*(1), 11326. https://doi.org/10.1038/s41598-018-29720-z

St Rose, S. G., Hunter, N., Foster, J. D., Drummond, D., McKenzie, C., Parnham, D., Will, R. G., Woolhouse, M. E., & Rhind, S. M. (2007). Quantification of Peyer's patches in Cheviot sheep for future scrapie pathogenesis studies. *Vet Immunol Immunopathol*, *116*(3-4), 163-171. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2007.01.017

St Rose, S. G., Hunter, N., Matthews, L., Foster, J. D., Chase-Topping, M. E., Kruuk, L. E., Shaw, D. J., Rhind, S. M., Will, R. G., & Woolhouse, M. E. (2006). Comparative evidence for a link between Peyer's patch development and susceptibility to transmissible spongiform encephalopathies. *BMC Infect Dis*, *6*, 5. https://doi.org/10.1186/1471-2334-6-5

Stahl, N., Baldwin, M. A., Hecker, R., Pan, K. M., Burlingame, A. L., & Prusiner, S. B. (1992). Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid. *Biochemistry*, *31*(21), 5043-5053. https://doi.org/10.1021/bi00136a600

Stamp, J. (1962). Scrapie: a transmissible disease of sheep. *Vet. Rec*, *74*(12), 357-362.

Stephens, M., Liao, S., & von der Weid, P. Y. (2021). Ultra-purification of Lipopolysaccharides reveals species-specific signalling bias of TLR4: importance in macrophage function. *Sci Rep*, *11*(1), 1335. https://doi.org/10.1038/s41598-020-79145-w

Stephenson, J., Nutma, E., van der Valk, P., & Amor, S. (2018). Inflammation in CNS neurodegenerative diseases. *Immunology*, *154*(2), 204-219. https://doi.org/10.1111/imm.12922

Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T., & Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, *11*(2), 155-161. https://doi.org/10.1038/ni.1836

Streit, W. J., Sammons, N. W., Kuhns, A. J., & Sparks, D. L. (2004). Dystrophic microglia in the aging human brain. *Glia*, *45*(2), 208-212. https://doi.org/10.1002/glia.10319

Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., & Federoff, H. J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, *29*(11), 1690-1701. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006

Summerfield, A., Auray, G., & Ricklin, M. (2015). Comparative dendritic cell biology of veterinary mammals. *Annu Rev Anim Biosci*, *3*, 533-557. https://doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-111009

Sunde, M., & Blake, C. (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem*, *50*, 123-159. https://doi.org/10.1016/s0065-3233(08)60320-4

Suresh, R., & Mosser, D. M. (2013). Pattern recognition receptors in innate immunity, host defense, and immunopathology. *Adv Physiol Educ*, *37*(4), 284-291. https://doi.org/10.1152/advan.00058.2013

Tabouret, G., Lacroux, C., Lugan, S., Costes, P., Corbiere, F., Weisbecker, J. L., Schelcher, F., & Andreoletti, O. (2010). Relevance of oral experimental challenge with classical scrapie in sheep. *J Gen Virol*, *91*(Pt 8), 2139-2144. https://doi.org/10.1099/vir.0.021311-0

Tahara, K., Kim, H. D., Jin, J. J., Maxwell, J. A., Li, L., & Fukuchi, K. (2006). Role of toll-like receptor signalling in Abeta uptake and clearance. *Brain*, *129*(Pt 11), 3006-3019. https://doi.org/10.1093/brain/awl249

Takagi, H., Arimura, K., Uto, T., Fukaya, T., Nakamura, T., Choijookhuu, N., Hishikawa, Y., & Sato, K. (2016). Plasmacytoid dendritic cells orchestrate TLR7-mediated innate and adaptive immunity for the initiation of autoimmune inflammation. *Sci Rep*, *6*, 24477. https://doi.org/10.1038/srep24477

Takakura, I., Miyazawa, K., Kanaya, T., Itani, W., Watanabe, K., Ohwada, S., Watanabe, H., Hondo, T., Rose, M. T., Mori, T., Sakaguchi, S., Nishida, N., Katamine, S., Yamaguchi, T., & Aso, H. (2011). Orally administered prion protein is incorporated by m cells and spreads into lymphoid tissues with macrophages in prion protein knockout mice. *Am J Pathol*, *179*(3), 1301-1309. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.05.058

Takeda, K., & Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, *17*(1), 1-14. https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186

Takeuchi, O., & Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, *140*(6), 805-820. https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022

Tam, W. Y., & Ma, C. H. (2014). Bipolar/rod-shaped microglia are proliferating microglia with distinct M1/M2 phenotypes. *Sci Rep*, *4*, 7279. https://doi.org/10.1038/srep07279

Tan, Y., Zanoni, I., Cullen, T. W., Goodman, A. L., & Kagan, J. C. (2015). Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by

Pathogenic and Commensal Bacteria. *Immunity*, *43*(5), 909-922. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.10.008

Tang, S. C., Lathia, J. D., Selvaraj, P. K., Jo, D. G., Mughal, M. R., Cheng, A., Siler, D. A., Markesbery, W. R., Arumugam, T. V., & Mattson, M. P. (2008). Toll-like receptor-4 mediates neuronal apoptosis induced by amyloid beta-peptide and the membrane lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal. *Exp Neurol*, *213*(1), 114-121. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2008.05.014

Taylor, S. E., Morganti-Kossmann, C., Lifshitz, J., & Ziebell, J. M. (2014). Rod microglia: a morphological definition. *PLoS One*, *9*(5), e97096. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097096

Tiwari, R. K., Moin, A., Rizvi, S. M. D., Shahid, S. M. A., & Bajpai, P. (2021). Modulating neuroinflammation in neurodegeneration-related dementia: can microglial toll-like receptors pull the plug? *Metab Brain Dis*, *36*(5), 829-847. https://doi.org/10.1007/s11011-021-00696-6

Travis, J. (2011). Immunology Prize Overshadowed by Untimely Death of Awardee. *Science*, *334*(6052), 31-31. https://doi.org/doi:10.1126/science.334.6052.31

Trombetta, E. S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., & Mellman, I. (2003). Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science*, *299*(5611), 1400-1403. https://doi.org/10.1126/science.1080106

Trudler, D., Farfara, D., & Frenkel, D. (2010). Toll-like receptors expression and signaling in glia cells in neuro-amyloidogenic diseases: towards future therapeutic application. *Mediators Inflamm*, *2010*. https://doi.org/10.1155/2010/497987

Turco, F., Sarnelli, G., Cirillo, C., Palumbo, I., De Giorgi, F., D'Alessandro, A., Cammarota, M., Giuliano, M., & Cuomo, R. (2014). Enteroglial-derived S100B protein integrates bacteria-induced Toll-like receptor signalling in human enteric glial cells. *Gut*, *63*(1), 105-115. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302090

Turin, L., & Riva, F. (2008). Toll-like receptor family in domestic animal species. *Crit Rev Immunol*, *28*(6), 513-538. https://doi.org/10.1615/critrevimmunol.v28.i6.30

Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M., Sato, S., Tsujimura, T., Yamamoto, M., Yokota, Y., Kiyono, H., Miyasaka, M., Ishii, K. J., & Akira, S. (2008). Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*, *9*(7), 769-776. https://doi.org/10.1038/ni.1622

Uematsu, S., Jang, M. H., Chevrier, N., Guo, Z., Kumagai, Y., Yamamoto, M., Kato, H., Sougawa, N., Matsui, H., Kuwata, H., Hemmi, H., Coban, C., Kawai, T., Ishii, K. J., Takeuchi, O., Miyasaka, M., Takeda, K., & Akira, S. (2006). Detection of pathogenic intestinal bacteria by Toll-like receptor 5 on intestinal CD11c+ lamina propria cells. *Nat Immunol*, *7*(8), 868-874. https://doi.org/10.1038/ni1362

Umar, S. (2010). Intestinal stem cells. *Curr Gastroenterol Rep*, *12*(5), 340-348. https://doi.org/10.1007/s11894-010-0130-3

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M., & Aderem, A. (1999). The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature*, *401*(6755), 811-815. https://doi.org/10.1038/44605

Urayama, A., Concha-Marambio, L., Khan, U., Bravo-Alegria, J., Kharat, V., & Soto, C. (2016). Prions efficiently cross the intestinal barrier after oral administration: Study of the bioavailability, and cellular and tissue distribution in vivo. *Sci Rep*, *6*, 32338. https://doi.org/10.1038/srep32338

USDA. (2019). *National scrapie surveillance plan*. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service. https://www.aphis.usda.gov/animal_health/animal_diseases/scrapie/downloads/national_scrapie_surv_plan.pdf

Uttley, L., Carroll, C., Wong, R., Hilton, D. A., & Stevenson, M. (2020). Creutzfeldt-Jakob disease: a systematic review of global incidence, prevalence, infectivity, and incubation. *Lancet Infect Dis*, *20*(1), e2-e10. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30615-2

van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G., & Langevoort, H. L. (1972). The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*, *46*(6), 845-852. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4538544

van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Meloen, R. H., Mooij-Harkes, G., Vromans, M. E., & Langeveld, J. P. (1996). Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie. *J Clin Microbiol*, *34*(5), 1228-1231. https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1228-1231.1996

van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (2000). Pathogenesis of natural scrapie in sheep. *Arch Virol Suppl*(16), 57-71. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-6308-5_5

van Keulen, L. J., Vromans, M. E., Dolstra, C. H., Bossers, A., & van Zijderveld, F. G. (2008). Pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in sheep. *Arch Virol*, *153*(3), 445-453. https://doi.org/10.1007/s00705-007-0007-4

van Keulen, L. J., Vromans, M. E., & van Zijderveld, F. G. (2002). Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *APMIS*, *110*(1), 23-32. https://doi.org/10.1034/j.1600-0463.2002.100104.x

Vana, K., Zuber, C., Pflanz, H., Kolodziejczak, D., Zemora, G., Bergmann, A. K., & Weiss, S. (2009). LRP/LR as an alternative promising target in therapy of prion diseases, Alzheimer's disease and cancer. *Infect Disord Drug Targets*, *9*(1), 69-80. https://doi.org/10.2174/1871526510909010069

Vargas, F., Lujan, L., Bolea, R., Monleon, E., Martin-Burriel, I., Fernandez, A., De Blas, I., & Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, *20*(1), 187-193. https://doi.org/10.1892/0891-6640(2006)20[187:daceos]2.0.co;2

Vaure, C., & Liu, Y. (2014). A comparative review of toll-like receptor 4 expression and functionality in different animal species. *Front Immunol*, *5*, 316. https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00316

Vazquez-Carballo, C., Guerrero-Hue, M., Garcia-Caballero, C., Rayego-Mateos, S., Opazo-Rios, L., Morgado-Pascual, J. L., Herencia-Bellido, C., Vallejo-Mudarra, M., Cortegano, I., Gaspar, M. L., de Andres, B., Egido, J., & Moreno, J. A. (2021). Toll-Like Receptors in Acute Kidney Injury. *Int J Mol Sci*, *22*(2). https://doi.org/10.3390/ijms22020816

Venegas, C., & Heneka, M. T. (2017). Danger-associated molecular patterns in Alzheimer's disease. *J Leukoc Biol*, *101*(1), 87-98. https://doi.org/10.1189/jlb.3MR0416-204R

Vidal, E., Acin, C., Foradada, L., Monzon, M., Marquez, M., Monleon, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., & Bolea, R. (2009). Immunohistochemical characterisation of classical scrapie neuropathology in sheep. *J Comp Pathol*, *141*(2-3), 135-146. https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2009.04.002

Vijay, K. (2018). Toll-like receptors in immunity and inflammatory diseases: Past, present, and future. *Int Immunopharmacol*, *59*, 391-412. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.03.002

Vilotte, J. L., Soulier, S., Essalmani, R., Stinnakre, M. G., Vaiman, D., Lepourry, L., Da Silva, J. C., Besnard, N., Dawson, M., Buschmann, A., Groschup, M., Petit, S., Madelaine, M. F., Rakatobe, S., Le Dur, A., Vilette, D., & Laude, H. (2001). Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol*, *75*(13), 5977-5984. https://doi.org/10.1128/JVI.75.13.5977-5984.2001

Vincenti, J. E., Murphy, L., Grabert, K., McColl, B. W., Cancellotti, E., Freeman, T. C., & Manson, J. C. (2015). Defining the Microglia Response during the Time Course of Chronic Neurodegeneration. *J Virol*, *90*(6), 3003-3017. https://doi.org/10.1128/JVI.02613-15

Viola, A., Munari, F., Sanchez-Rodriguez, R., Scolaro, T., & Castegna, A. (2019). The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Front Immunol*, *10*, 1462. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462

Vuono, R., Kouli, A., Legault, E. M., Chagnon, L., Allinson, K. S., La Spada, A., Network, R. I. o. t. E. H. s. D., Biunno, I., Barker, R. A., & Drouin-Ouellet, J. (2020). Association Between Toll-Like Receptor 4 (TLR4) and Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 2 (TREM2) Genetic Variants and Clinical Progression of Huntington's Disease. *Mov Disord*, *35*(3), 401-408. https://doi.org/10.1002/mds.27911

Waisman, A., Liblau, R. S., & Becher, B. (2015). Innate and adaptive immune responses in the CNS. *Lancet Neurol*, *14*(9), 945-955. https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00141-6

Walker, D. G., Tang, T. M., & Lue, L. F. (2018). Increased expression of toll-like receptor 3, an anti-viral signaling molecule, and related genes in Alzheimer's disease brains. *Exp Neurol*, *309*, 91-106. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.016

Walter, S., Letiembre, M., Liu, Y., Heine, H., Penke, B., Hao, W., Bode, B., Manietta, N., Walter, J., Schulz-Schuffer, W., & Fassbender, K. (2007). Role of the toll-like receptor 4 in neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Cell Physiol Biochem*, *20*(6), 947-956. https://doi.org/10.1159/000110455

Wang, F., Wang, J., Liu, D., & Su, Y. (2010). Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. *Anal Biochem*, *399*(2), 211-217. https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.12.029

Wang, J., Zhao, D., Pan, B., Fu, Y., Shi, F., Kouadir, M., Yang, L., Yin, X., & Zhou, X. (2015). Toll-like receptor 2 deficiency shifts PrP106-126-induced microglial activation from a neurotoxic to a neuroprotective phenotype. *J Mol Neurosci*, *55*(4), 880-890. https://doi.org/10.1007/s12031-014-0442-0

Wang, S., Deng, S., Cao, Y., Zhang, R., Wang, Z., Jiang, X., Wang, J., Zhang, X., Zhang, J., Liu, G., & Lian, Z. (2018). Overexpression of Toll-Like Receptor 4 Contributes to Phagocytosis of Salmonella Enterica Serovar Typhimurium via Phosphoinositide 3-Kinase Signaling in Sheep. *Cell Physiol Biochem*, *49*(2), 662-677. https://doi.org/10.1159/000493032

Wang, Y., Chen, T., Han, C., He, D., Liu, H., An, H., Cai, Z., & Cao, X. (2007). Lysosome-associated small Rab GTPase Rab7b negatively regulates TLR4 signaling in macrophages by promoting lysosomal degradation of TLR4. *Blood*, *110*(3), 962-971. https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-066027

Watson, M. B., Richter, F., Lee, S. K., Gabby, L., Wu, J., Masliah, E., Effros, R. B., & Chesselet, M. F. (2012). Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol*, *237*(2), 318-334. https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.06.025

Watts, J. C., & Prusiner, S. B. (2014). Mouse models for studying the formation and propagation of prions. *J Biol Chem*, *289*(29), 19841-19849. https://doi.org/10.1074/jbc.R114.550707

Weissmann, C., Bueler, H., Fischer, M., Sailer, A., Aguzzi, A., & Aguet, M. (1994). PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci*, *724*, 235-240. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb38913.x

Weissmann, C., Raeber, A. J., Montrasio, F., Hegyi, I., Frigg, R., Klein, M. A., & Aguzzi, A. (2001). Prions and the lymphoreticular system. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *356*(1406), 177-184. https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0763

Wells, G. A., Hawkins, S. A., Green, R. B., Austin, A. R., Dexter, I., Spencer, Y. I., Chaplin, M. J., Stack, M. J., & Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec*, *142*(5), 103-106. https://doi.org/10.1136/vr.142.5.103

Wells, G. A., Spiropoulos, J., Hawkins, S. A., & Ryder, S. J. (2005). Pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy: preclinical infectivity in tonsil and observations on the distribution of lingual tonsil in slaughtered cattle. *Vet Rec*, *156*(13), 401-407. https://doi.org/10.1136/vr.156.13.401

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. https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-32

Werling, D., Piercy, J., & Coffey, T. J. (2006). Expression of TOLL-like receptors (TLR) by bovine antigen-presenting cells-potential role in pathogen discrimination? *Vet Immunol Immunopathol*, *112*(1-2), 2-11. https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2006.03.007

Westrom, B., Arevalo Sureda, E., Pierzynowska, K., Pierzynowski, S. G., & Perez-Cano, F. J. (2020). The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Front Immunol*, *11*, 1153. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01153

Wilesmith, J. W., Wells, G. A., Cranwell, M. P., & Ryan, J. B. (1988). Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet Rec*, *123*(25), 638-644. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3218047

Will, R. G., Ironside, J. W., Zeidler, M., Cousens, S. N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiari, M., Hofman, A., & Smith, P. G. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *Lancet*, *347*(9006), 921-925. https://doi.org/10.1016/s0140-6736(96)91412-9

Williams, A. E., van Dam, A. M., Man, A. H. W. K., Berkenbosch, F., Eikelenboom, P., & Fraser, H. (1994). Cytokines, prostaglandins and lipocortin-1 are present in the brains of scrapie-infected mice. *Brain Res*, *654*(2), 200-206. https://doi.org/10.1016/0006-8993(94)90480-4

Williams, A. S., Leung, S. Y., Nath, P., Khorasani, N. M., Bhavsar, P., Issa, R., Mitchell, J. A., Adcock, I. M., & Chung, K. F. (2007). Role of TLR2, TLR4, and MyD88 in murine ozone-induced airway hyperresponsiveness and neutrophilia. *J Appl Physiol (1985)*, *103*(4), 1189-1195. https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00172.2007

Williams, E. S., & Young, S. (1980). Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis*, *16*(1), 89-98. https://doi.org/10.7589/0090-3558-16.1.89

Windl, O., Dempster, M., Estibeiro, J. P., Lathe, R., de Silva, R., Esmonde, T., Will, R., Springbett, A., Campbell, T. A., Sidle, K. C., Palmer, M. S., & Collinge, J. (1996). Genetic basis of Creutzfeldt-Jakob disease in the United Kingdom: a systematic analysis of predisposing mutations and allelic variation in the PRNP gene. *Hum Genet*, *98*(3), 259-264. https://doi.org/10.1007/s004390050204

Wirths, O., Breyhan, H., Marcello, A., Cotel, M. C., Bruck, W., & Bayer, T. A. (2010). Inflammatory changes are tightly associated with neurodegeneration in the brain and spinal cord of the APP/PS1KI mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, *31*(5), 747-757. https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.011

Wood, J. L., McGill, I. S., Done, S. H., & Bradley, R. (1997). Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec*, *140*(7), 167-174. https://doi.org/10.1136/vr.140.7.167

Wyatt-Johnson, S. K., Herr, S. A., & Brewster, A. L. (2017). Status Epilepticus Triggers Time-Dependent Alterations in Microglia Abundance and Morphological Phenotypes in the Hippocampus. *Front Neurol*, *8*, 700. https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00700

Yang, L., Bai, J., Zhao, Z., Li, N., Wang, Y., & Zhang, L. (2019). Differential expression of T helper cytokines in the liver during early pregnancy in sheep. *Anim Reprod*, *16*(2), 332-339. https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0141

Yang, Y., Han, C., Guo, L., & Guan, Q. (2018). High expression of the HMGB1-TLR4 axis and its downstream signaling factors in patients with Parkinson's disease and the relationship of pathological staging. *Brain Behav*, *8*(4), e00948. https://doi.org/10.1002/brb3.948

Yim, Y. I., Park, B. C., Yadavalli, R., Zhao, X., Eisenberg, E., & Greene, L. E. (2015). The multivesicular body is the major internal site of prion conversion. *J Cell Sci*, *128*(7), 1434-1443. https://doi.org/10.1242/jcs.165472

Yoneyama, H., Matsuno, K., Zhang, Y., Nishiwaki, T., Kitabatake, M., Ueha, S., Narumi, S., Morikawa, S., Ezaki, T., Lu, B., Gerard, C., Ishikawa, S., & Matsushima, K. (2004). Evidence

for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol*, *16*(7), 915-928. https://doi.org/10.1093/intimm/dxh093

Yrlid, U., Cerovic, V., Milling, S., Jenkins, C. D., Zhang, J., Crocker, P. R., Klavinskis, L. S., & MacPherson, G. G. (2006). Plasmacytoid dendritic cells do not migrate in intestinal or hepatic lymph. *J Immunol*, *177*(9), 6115-6121. https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.9.6115

Yrlid, U., Milling, S. W., Miller, J. L., Cartland, S., Jenkins, C. D., & MacPherson, G. G. (2006). Regulation of intestinal dendritic cell migration and activation by plasmacytoid dendritic cells, TNF-alpha and type 1 IFNs after feeding a TLR7/8 ligand. *J Immunol*, *176*(9), 5205-5212. https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.9.5205

Zabel, M. D., & Avery, A. C. (2015). Prions--not your immunologist's pathogen. *PLoS Pathog*, *11*(2), e1004624. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004624

Zahn, R. (2003). The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site. *J Mol Biol*, *334*(3), 477-488. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.09.048

Zahn, R., Liu, A., Luhrs, T., Riek, R., von Schroetter, C., Lopez Garcia, F., Billeter, M., Calzolai, L., Wider, G., & Wuthrich, K. (2000). NMR solution structure of the human prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(1), 145-150. https://doi.org/10.1073/pnas.97.1.145

Zanoni, I., Ostuni, R., Marek, L. R., Barresi, S., Barbalat, R., Barton, G. M., Granucci, F., & Kagan, J. C. (2011). CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell*, *147*(4), 868-880. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.051

Zhang, C. C., Steele, A. D., Lindquist, S., & Lodish, H. F. (2006). Prion protein is expressed on long-term repopulating hematopoietic stem cells and is important for their self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(7), 2184-2189. https://doi.org/10.1073/pnas.0510577103

Zhang, G., & Ghosh, S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *J Biol Chem*, *277*(9), 7059-7065. https://doi.org/10.1074/jbc.M109537200

Zhang, L., Li, N., Fan, B., Fang, M., & Xu, W. (2004). PRNP polymorphisms in Chinese ovine, caprine and bovine breeds. *Anim Genet*, *35*(6), 457-461. https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2004.01204.x

Zhang, M., Chen, L., Wang, S., & Wang, T. (2009). Rab7: roles in membrane trafficking and disease. *Biosci Rep*, *29*(3), 193-209. https://doi.org/10.1042/BSR20090032

Zhao, X., Sato, A., Dela Cruz, C. S., Linehan, M., Luegering, A., Kucharzik, T., Shirakawa, A. K., Marquez, G., Farber, J. M., Williams, I., & Iwasaki, A. (2003). CCL9 is secreted by the follicle-associated epithelium and recruits dome region Peyer's patch CD11b+ dendritic cells. *J Immunol*, *171*(6), 2797-2803. https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.6.2797

Zhou, B., Zuo, Y. X., & Jiang, R. T. (2019). Astrocyte morphology: Diversity, plasticity, and role in neurological diseases. *CNS Neurosci Ther*, *25*(6), 665-673. https://doi.org/10.1111/cns.13123

Zhu, C., Herrmann, U. S., Falsig, J., Abakumova, I., Nuvolone, M., Schwarz, P., Frauenknecht, K., Rushing, E. J., & Aguzzi, A. (2016). A neuroprotective role for microglia in prion diseases. *J Exp Med*, *213*(6), 1047-1059. https://doi.org/10.1084/jem.20151000

Zhu, J., & Mohan, C. (2010). Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm*, *2010*, 781235. https://doi.org/10.1155/2010/781235

Zhu, S., Victoria, G. S., Marzo, L., Ghosh, R., & Zurzolo, C. (2015). Prion aggregates transfer through tunneling nanotubes in endocytic vesicles. *Prion*, *9*(2), 125-135. https://doi.org/10.1080/19336896.2015.1025189

Ziebell, J. M., Taylor, S. E., Cao, T., Harrison, J. L., & Lifshitz, J. (2012). Rod microglia: elongation, alignment, and coupling to form trains across the somatosensory cortex after experimental diffuse brain injury. *J Neuroinflammation*, *9*, 247. https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-247

Zomosa-Signoret, V., Arnaud, J. D., Fontes, P., Alvarez-Martinez, M. T., & Liautard, J. P. (2008). Physiological role of the cellular prion protein. *Vet Res*, *39*(4), 9. https://doi.org/10.1051/vetres:2007048