



Universidad
Zaragoza

Autofagia en Enfermedades Priónicas

Trabajo de Fin de Grado
Biología
2016-2017

Autora

Laura Solanas Laguna

Directores

Inmaculada Martín Burriel

Óscar López Pérez

unizar.es

ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Antecedentes	2-8
2.1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs)	
2.1.1. Scrapie	
2.1.1.1. Resistencia genética a las EETs	
2.1.1.2. Diagnóstico	
2.1.1.3. Patogenia y transmisión	
2.1.2. Modelos murinos: Tg338	
2.2. Autofagia: mecanismos moleculares	
2.3. Autofagia en las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles	
3. Objetivos	9
4. Material y métodos	10-12
4.1. Muestras	
4.2. Lesiones histopatológicas	
4.2.1. Hematoxilina y eosina	
4.2.2. PET Blot	
4.3. Estudios de expresión génica	
4.3.1. qPCR	
4.4. Determinación inmunohistoquímica de marcadores de autofagia	
4.4.1. Inmunohistoquímica	
4.5. Análisis de datos	
5. Resultados y discusión	13-20
5.1. Lesiones	
5.2. Expresión	
5.3. Determinación de autofagia mediante inmunohistoquímica: marcadores LC3-II y p62	
6. Conclusiones	21
7. Bibliografía	22-25
Anexos	2 págs

1 Resumen

El scrapie, Encefalopatía Espongiforme Transmisible ovina y caprina, es una enfermedad neurológica que afecta al sistema nervioso central (SNC). El agente patógeno, PrP^{Sc}, se caracteriza por su alta resistencia a tratamientos físicos y químicos, su largo periodo de incubación y su acumulación en el SNC. La autofagia es un proceso intracelular mediado por lisosomas que limpia el citoplasma y degrada componentes dañados. Aunque se asocia a varias enfermedades neurodegenerativas, no hay muchos estudios que hayan analizado el efecto que dicho evento celular puede tener sobre el scrapie. En este trabajo se ha estudiado la inducción de la autofagia en un modelo murino de scrapie en distintas fases de la enfermedad. Se pretende comprobar si este modelo es adecuado para continuar la investigación en este ámbito. Se ha trabajado con ratones Tg338 que sobreexpresan el alelo VRQ del gen *PNRP* ovino. Sobre cortes de tejido cerebral se valoraron las lesiones histopatológicas de scrapie mediante la tinción con hematoxilina y eosina y la técnica PET Blot. Además, se realizaron estudios de expresión génica de seis marcadores (*Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* y *Gas5*), seleccionados por su papel en la regulación de la autofagia. Para ello se empleó la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Finalmente, mediante técnicas inmunohistoquímicas detectamos los marcadores LC3-II y p62. Tanto este marcaje como las lesiones histopatológicas se valoraron de forma semicuantitativa. La disminución de *Atg5* ($p=0.05$) y el incremento de marcaje de p62 en la fase clínica sugieren una inhibición del proceso de autofagia en la fase tardía de la enfermedad. Además la similitud observada entre el modelo y las lesiones descritas en ovejas con scrapie clásico confirman la idoneidad del modelo murino Tg338 para la continuación de la investigación en esta línea.

Summary

Scrapie, ovine and caprine Transmissible Spongiform Encephalopathy, is a neurological disease that affects the central nervous system (CNS). High resistance to physical and chemical treatments, large incubation period and accumulation in CNS characterizes the pathogenic agent (PrP^{Sc}). Autophagy, an intracellular mechanism involved in cytoplasm cleaning and degradation of damaged components by lysosomes, is associated with several neurodegenerative diseases. However, few studies have focused on the possible role of autophagy in TSEs. Here, the role of autophagy is studied in a scrapie murine model to confirm the suitability of this model to continue the research in this field. We used Tg338 mice, a model that overexpress the VRQ allele of *PNRP* ovine gene. Histopathological lesions were evaluated in tissue sections by hematoxylin-eosine staining and PET blot. We analysed the expression of genes involved in autophagy regulation (*Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* and *Gas5*) by real time quantitative PCR (qPCR). Immunohistochemical determination of LC3-II and p62 was also performed. Immunostaining and scrapie lesions were semi-quantitatively evaluated. Both, *Atg5* downregulation and the increment of p62 in the clinical phase of the disease, suggested autophagy inhibition in the late period of prion disease. In addition, murine model and sheep naturally infected with classical scrapie had a similar behaviour, therefore Tg338 mice would be an adequate model to continue the investigation.

2 Antecedentes

En este apartado se introducirán aspectos generales de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles, profundizando en el scrapie ovino y los modelos murinos utilizados para su estudio, especialmente Tg338. Finalmente, se describirá la autofagia como proceso de muerte y/o de supervivencia celular.

2.1. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET)

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EETs) constituyen un conjunto de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones. Afectan a animales y humanos y provocan una degeneración progresiva de tipo esponjiforme del sistema nervioso central (SNC) que se manifiesta por un conjunto de síntomas nerviosos instaurados tras un largo periodo de incubación [1].

Los priones están constituidos por una proteína anómala, la proteína priónica resistente a proteasas PrP^{Res}, que se diferencia en la estructura espacial de la proteína presente en el tejido neuronal, proteína priónica celular (PrP^c). La primera se caracteriza por una estructura secundaria rica en láminas β , mientras que la forma celular lo es en hélices α . La PrP^{Res} es capaz de inducir la transformación de la PrP^c en nuevas moléculas de PrP^{Res} que se acumulan y dañan el tejido. Los priones son muy resistentes a tratamientos con altas temperaturas, formaldehído, radiación UV y a radiaciones ionizantes. Además, también se caracterizan por la insolubilidad que presentan en presencia de detergentes y su resistencia parcial a la degradación proteolítica [1].

Entre las EETs humanas se encuentran la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) y su variante (vCJD), el Kuru, el insomnio familiar fatal (IFF) y la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) [2,3,4]. En cuanto a las EETs animales se conocen entre otras el scrapie de ovejas y cabras, objeto de estudio en este trabajo, la encefalopatía esponjiforme bovina (EEB), la caquexia crónica del ciervo (CWD), la encefalopatía esponjiforme felina (EEF) y la encefalopatía transmisible del visón (ETV) [5,6,7].

2.1.1. Scrapie

El scrapie clásico (encefalopatía esponjiforme ovina y caprina) es la enfermedad prototipo de las EETs y la que se conoce desde hace más tiempo. La primera descripción de esta patología data de 1732. Se caracteriza por la acumulación de la proteína prión de scrapie (PrP^{Sc}), principalmente en el sistema nervioso. Al igual que el resto de enfermedades priónicas su periodo de incubación es muy largo [8].

2.1.1.1. Resistencia genética a las EETs

El gen *PRNP* ovino localizado en el cromosoma 13, tiene un tamaño de 2000 pares de bases y codifica para una proteína de 256 aminoácidos (PrP). Presenta alto grado de polimorfismo y se conocen numerosas mutaciones que suponen un cambio de aminoácidos [9]. De ellas, tres

parecen tener mayor influencia en la susceptibilidad a la enfermedad y corresponden a los codones 136, 154 y 171. Los haplotipos asociados con distintos grados de susceptibilidad aparecen en la Tabla 1. Según la población o raza la frecuencia de los haplotipos varía [10].

Tabla 1. Haplotipos del gen *PRNP* ovino relacionados con la susceptibilidad a padecer scrapie. A: alanina, H: histidina, Q: glutamina, R: arginina, V: valina. Adaptado de [9].

Haplotipos	136	154	171
PrP ^{ARR}	A	R	R
PrP ^{AHQ}	A	H	Q
PrP ^{ARH}	A	R	H
PrP ^{ARQ}	A	R	Q
PrP ^{VRQ}	V	R	Q

Se ha observado que los haplotipos VRQ y ARQ están asociados a una alta susceptibilidad al scrapie clásico y ARR y AHQ a una baja susceptibilidad [9].

2.1.1.2. Diagnóstico

Las enfermedades priónicas no se pueden diagnosticar mediante la mayoría de los métodos convencionales. Esto es debido, por un lado, a las características del agente infeccioso (signos inespecíficos y largos periodos de incubación) que dificultan su diagnóstico clínico, y por otro, a la biología del prión, que al tratarse de una proteína, no se puede detectar mediante técnicas basadas en la detección del genoma como la PCR. A esto se suma el hecho de que la PrP^{Sc} en los individuos infectados no se detecta como extraña, por lo que no produce respuesta inmunitaria y no se pueden utilizar técnicas serológicas. De modo que los métodos de laboratorio empleados para diagnosticar las EETs se realizan post-mortem en muestras de tejido del SNC y están basadas en la observación de las lesiones características de este grupo de enfermedades mediante examen histopatológico y en la detección de la PrP^{Sc} mediante técnicas inmunohistoquímicas (IHQ) o técnicas rápidas como ELISA y Western blotting [11].

Las lesiones características de las EETs pueden diferenciarse mediante la observación con microscopía óptica tras realizar una tinción de las muestras con hematoxilina-eosina. La más característica es la degeneración espongiiforme que consiste en la vacuolización de los cuerpos neuronales y del neuropilo en regiones anatómicas concretas. En scrapie clásico las lesiones tienden a acumularse en la zona del tronco del encéfalo, sobre todo en médula oblongada a nivel del óxex, y el tálamo [12]. Otras lesiones son la gliosis, la degeneración y pérdida neuronal y, en ocasiones, la amiloidosis cerebral [13].

Como la observación de las lesiones no es suficiente para confirmar el diagnóstico, se necesita detectar la presencia del marcador molecular PrP^{Sc}. Su acumulación es anterior a la neurodegeneración espongiiforme [14]. Se emplean las siguientes técnicas: Paraffin-embedded tissues (PET) blot, inmunohistoquímica (IHQ), Western blotting y la demostración de las fibrillas asociadas al scrapie (SAF) mediante microscopía electrónica, [15]. El PET blot permite determinar la presencia de la proteína patológica y su distribución topográfica en el tejido mediante el empleo de anticuerpos que detectan la PrP^{Sc}. [16]. Se emplea en este trabajo en

lugar de la IHQ que también utiliza anticuerpos específicos, ya que el modelo murino de ratón transgénico Tg338 sobreexpresa la PrP y con la IHQ se obtienen tinciones inespecíficas [16].

2.1.1.3. Patogenia y transmisión

La transmisión del scrapie clásico suele darse por contacto directo entre animales o a través de un ambiente contaminado. La PrP^{Sc} se elimina vía heces u orina y secreciones como la leche o la saliva siendo las fuentes principales de contaminación ambiental las heces, las placentas y las carcasas de animales infectados [17]. También puede darse la transmisión materna al feto [18].

Generalmente los priones llegan al intestino por vía oral y pasan al sistema linforreticular (SLR) del tracto intestinal donde se acumulan. Se replican en los macrófagos y células dendríticas foliculares de los folículos linfoides. Posteriormente llegan al SNC directa o indirectamente. En el primer caso a través del sistema nervioso periférico y en el segundo caso, a través del SLR (nódulos linfáticos, bazo y amígdalas) y consecutivamente, del sistema nervioso periférico [19,20,21].

2.1.2. Modelos murinos: Tg338

Se emplean diversidad de modelos de ratón en la experimentación. Actualmente, hay caracterizadas 426 líneas distintas [22] que difieren en sus características genómicas y presentan distintas respuestas frente a los tratamientos. Sobre ellas se realizan Knock-Out (KO), Knock-In y otras modificaciones con el fin de obtener el modelo más adecuado para el objetivo de la investigación.

Uno de los modelos murinos más destacados para el estudio de las EETs son los ratones KO para la PrP: Prnp^{-/-} [23], como 129-PrnPtm2Edin/J (nomenclatura tipo de la base de datos International Mouse Strain Resource, IMSR). Estos ratones no expresan la PrP. A partir de ellos, se han generado múltiples líneas que sobreexpresan la PrP de otras especies. Algunos modelos murinos a destacar son:

Prnptm2Edin tg(moPrnp BoPrP)110/J, cuyo ratón homocigoto sobreexpresa la proteína PrP bovina en ratones Prnp^{-/-}. El nivel de expresión de la PrP bovina en el cerebro de estos ratones es aproximadamente ocho veces superior que en el cerebro de los bovinos. Estos ratones son muy susceptibles a los priones de bovino [24,25,26,27].

Prnptm2Edin tg(moPrnp PoPrP)001/J. En este caso, se reintrodujo el constructo PrP de porcino bajo el control del promotor PrP de murino en un animal Prnp^{-/-}. El nivel de sobreexpresión de proteína PrP porcina es cuatro veces superior a la que se expresa en el cerebro del cerdo. Este modelo de ratón muestra diferente susceptibilidad a varias de las enfermedades priónicas [28,29].

Prnptm2Edin tg(moPrnp 129Met-HuPrP-340)/J o bien Prnp tm2Edin tg(moPrnp 129Val-HuPrP-361)/J. En estos animales el nivel de sobreexpresión de la de la PrP humana en ratones Prnp^{-/-} es dos veces superior a la producida en el cerebro humano. Estas líneas son muy susceptibles a la transmisión de cepas humanas y son modelos muy adecuados para el estudio de la susceptibilidad del ser humano a priones de otras especies [30,31,32].

En la realización de este trabajo se ha utilizado el modelo murino de Scrapie Tg338 (no aparece registrado en la IMSR). Estos transgénicos se caracterizan por expresar el alelo VRQ del gen *PRNP* ovino. Se crearon a partir de un ratón KO para el gen PrP (PrP^{-/-}), al que se le introdujo un inserto de 125kb con el gen *PRNP* de oveja clonado en un cromosoma artificial bacteriano (BAC). Estos animales son homocigotos para el transgén y sobreexpresan entre 8 y 10 veces la PrP ovina, lo que los hace muy susceptibles a la infección con scrapie [33].

2.2. Autofagia: mecanismos moleculares

El término autofagia, (del griego: auto = “uno mismo” y phagein = “comer”), fue introducido por Christian de Duve en 1963 [34] y se ha convertido con el tiempo en un proceso relevante de estudio que parece estar implicado en una gran variedad de situaciones tanto fisiológicas como patológicas [35]. Es un proceso intracelular mediado por lisosomas, común en todos los organismos, que se produce para limpiar el citoplasma y degradar componentes dañados [36], es decir, es una vía catabólica mediante la cual la célula degrada proteínas de vida media larga, además de otras macromoléculas y orgánulos [37]. Se ha descrito como un proceso que sucede de forma basal (“autofagia basal”), sin embargo, si se somete a la célula a ciertos estímulos, el nivel de autofagia puede aumentar, lo que se conoce como “autofagia inducida”. Esto sucede en casos de privación de nutrientes, disminución de factores de crecimiento, acumulación de componentes celulares dañados [38], o bien, debido a la infección por patógenos o estrés oncogénico [39]. Además, este proceso influye en la diferenciación, desarrollo, mantenimiento e inmunidad celular. Más recientemente, se le han asociado también nuevas funciones relacionadas con rutas secretorias, dejando de lado su papel degradativo [40].

Se han descrito tres mecanismos principales de autofagia para introducir el material citoplasmático en el lisosoma: (1) la autofagia mediada por chaperonas, exclusiva de mamíferos, donde proteínas asociadas a chaperonas (hsc70, hip, hop, bag-1, hsp40 y hsp90) que contienen la secuencia aminoacídica KFERQ se unen al receptor lisosomal LAMP-2A y son liberadas directamente al lumen donde son degradadas por enzimas hidrolíticas; (2) la microautofagia, en la que la carga pasa al lumen por invaginación de la membrana lisosomal; y por último, (3) la macroautofagia, en la que se forma un autofagosoma de doble membrana que envuelve el contenido citoplasmático y que, a continuación, se fusiona con el lisosoma para formar un autolisosoma donde tanto el contenido como la membrana serán degradados por hidrolasas [39].

De estos tres mecanismos, la forma más común y mejor caracterizada es la macroautofagia. Es un proceso muy conservado y estudiado en levaduras, plantas y animales. Las proteínas que participan en el mismo aparecen recogidas en la Tabla I del Anexo.

Como muestra la Figura 1 que describe la autofagia en mamíferos, se dan cuatro etapas hasta obtener la formación de los autolisosomas: iniciación, nucleación, elongación y la maduración.

- (A) Iniciación: en ausencia de nutrientes la kinasa AMPK fosforila mTORC1, el cual se disocia del complejo ULK, permitiendo su activación. Por otro lado, AMBRA-1 facilita la interacción de Beclin-1 con p150 y VPS34 en el complejo PI3K-III [41].

- (B) Nucleación: Los complejos ULK y PI3K-III se trasladan al “sitio de ensamblado del fagóforo” (PAS) con la ayuda de ATG9 y VMP1, donde PI3K-III va a comenzar a reclutar fosfolípidos y proteínas para la formación de la membrana de aislamiento inicial [41].
- (C) Elongación: A continuación, ATG7 y ATG10 se activan e inducen la formación del dímero ATG5-ATG12. Después, el dímero se une a ATG16L1 y se crea el complejo de alargamiento. Por otro lado, se produce la escisión y lipidación de LC3 a LC3-I y, luego a LC3-II, que es la forma que se une a la membrana interna y externa del fagóforo en formación. Debido a su localización, LC3-II actúa como un marcador de reconocimiento que permite la detección del autofagosoma maduro [41].
- (D) Maduración: Una vez que el fagosoma se ha cerrado y la fracción de LC3-II exterior ha sido retirada, se fusiona con el lisosoma a través de un proceso de acoplamiento en el que participan miembros de syntaxina y las proteínas lisosomales LAMP1 y LAMP2 dando lugar al autolisosoma. El contenido se degrada mediante hidrolasas lisosomales y es recogido por numerosos efectores para ser reciclado [41].

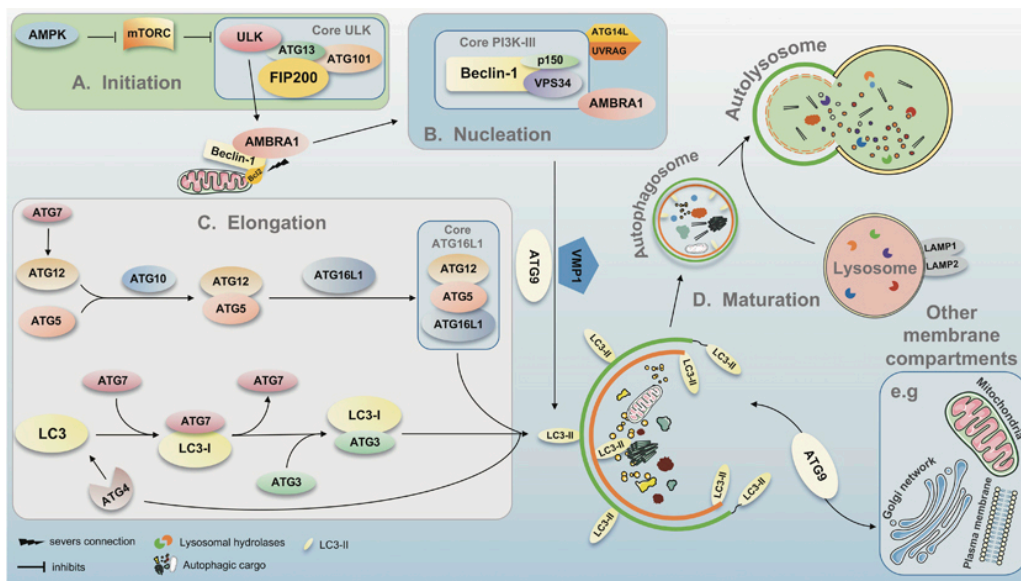


Figura 1. Representación del mecanismo de la autofagia en células de mamíferos. De [41].

2.3. Autofagia en las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles

La apoptosis y la autofagia son los mecanismos que más se relacionan con la muerte neuronal en las enfermedades priónicas [42]. A menudo, ambos procesos se entrelazan, es decir, la autofagia puede coexistir o preceder a la apoptosis, como respuesta celular a estímulos nocivos intra y extracelulares, puede estar inducida por estímulos de apoptosis, o puede condicionar la sensibilidad neuronal a los estímulos apoptóticos [43]. La presencia de vacuolas autofágicas en las EETs se ha descrito tanto en el pericarion neuronal como en los axones y sinapsis [44].

En animales modelo de enfermedades priónicas se han estudiado los posibles mecanismos moleculares de la autofagia. Por ejemplo, la inoculación de PrP^{Sc} en la línea celular SMB-S15

produce una sobreexpresión de FBXW7, proteína que interviene en la ubiquitinación y degradación de MTOR. Los niveles bajos de MTOR dan lugar a un incremento de autofagia, lo que, a su vez, se relaciona con la degradación de PrP^{Sc} [45]. En este caso, la inducción de FBXW7 daría lugar a una respuesta neuroprotectora del organismo en presencia del prion. La Figura 2 muestra los mecanismos moleculares relacionados con esta respuesta.

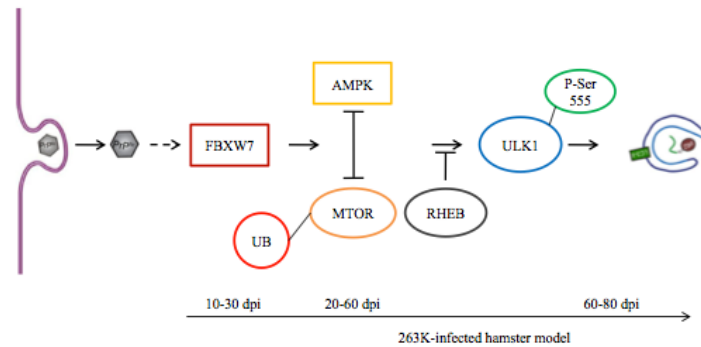


Figura 2. Adaptada de [45]. La proteína priónica prion provoca el aumento de la proteína FBXW7, dando lugar a la ubiquitinación de MTOR. La disminución de su concentración a nivel celular provocaría un incremento de la autofagia y una degradación de PrP^{Sc}.

En un estudio sin publicar del grupo donde se ha realizado el presente Trabajo de Fin de Grado, se observó un incremento del microRNA miR-223 en el modelo murino de scrapie Tg501. Este miRNA regula la expresión de FBXW7 [46], por lo que podría estar implicado en la regulación de la autofagia en enfermedades priónicas. En este estudio también se observó la regulación diferencial de miR125b, que entre sus dianas tiene genes involucrados en la regulación de la autofagia como *E2f1* [47].

Otros RNA no codificantes se han relacionado con la autofagia, como *Gas5* (growth arrest-specific 5), un lncRNA (long non-coding RNAs) que inhibe la proliferación celular y promueve la apoptosis de múltiples tipos celulares [48]. Los cambios en su expresión nunca se han estudiado en enfermedades priónicas.

En el mismo grupo de investigación, se estudió previamente la autofagia en un modelo natural de enfermedad priónica, el ovino con scrapie, donde se seleccionaron *ATG5*, *ATG6*, *ATG9* y *LC3* como marcadores de autofagia en el estudio de expresión génica. Cabe referenciar su artículo pendiente de publicación “Spatial Distribution of Autophagy Markers in the Central Nervous System of Sheep Naturally Infected by Scrapie” (López Pérez, et al.) [49] que concluye que existe una correlación entre los marcadores de la autofagia y el depósito de proteína priónica en el sistema nervioso central de la oveja infectada de forma natural con scrapie, sugiriendo la inducción de este proceso en la enfermedad natural. Sin embargo, el incremento de la expresión de la proteína *ATG5*, que participa en la elongación y maduración del autofagosoma, se veía acompañada de la disminución en la expresión de los transcritos, sugiriendo una inhibición de la maquinaria de la autofagia en las zonas que aparecen muy afectadas, lo que podría facilitar la replicación del prion. Por el contrario, poblaciones celulares específicas como las células de Purkinje del cerebelo, podrían mantener la maquinaria de la autofagia intacta lo que facilitaría la eliminación del prion y la supervivencia celular. Por lo tanto, el incremento observado en diferentes marcadores de autofagia podría indicar una

combinación de efectos positivos o negativos en la proliferación priónica. En este trabajo no se observaron cambios significativos en el marcador de autofagia LC3-II.

Aunque LC3-II es considerado el marcador de autofagia por excelencia, también se pueden estudiar otro tipo de marcadores, como p62. p62 fue la primera proteína descubierta con función de andamiaje (“scaffold”), en vías de señalización de la regulación del crecimiento y proliferación celular. Sin embargo, también fue detectada en agregados de proteínas ubiquitinadas. De hecho, p62 posee un dominio de unión a residuos ubiquitinados (UBA) en el extremo C-terminal y una secuencia corta de unión a LC3 (LC3-interacting region o LIR). Estudios en ratones KO y *Drosophila* han revelado que se requiere p62 para la degradación de proteínas ubiquitinadas y esto podría ser esencial en el proceso de la autofagia. Los niveles de p62 presentan una correlación inversa con la degradación por autofagia, así como con la pérdida de genes *ATG* o con factores necesarios para la fusión de los autofagosomas con los lisosomas. Así, la determinación de la acumulación de inclusiones de p62 en ensayos inmunoquímicos se utiliza como marcador de la disminución del proceso de autofagia (Figura 3). Además, p62 también puede determinar la carga ubiquitinada que va a ser dirigida al proteasoma, aunque es más probable que esta sea degradada por autofagia [50].

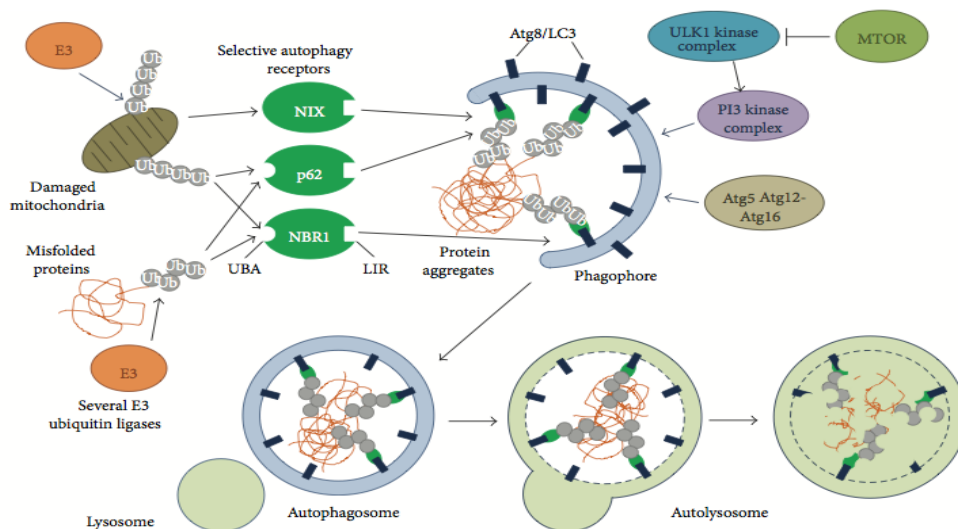


Figura 3. Papel de p62 y otras proteínas en la autofagia. De [50].

En 2014, varios grupos de la Universidad de Nagasaki, Japón, trataron de aclarar el mecanismo de eliminación de la PrP^{Sc}, y observaron un incremento de la expresión de p62 en cerebros y cultivos celulares infectados con priones que asociaron con una reducción de cantidad de PrP^{Sc}, lo que indicaba que la activación de p62, podría acelerar la depuración de PrP^{Sc} [51]. De forma similar, otro estudio publicado un año antes, había demostrado cómo la proteína p62/sequestosome1 (SQSTM1) juega un papel importante en la homeostasis de PrP^{Sc} a través de los lisosomas formados durante la autofagia. Se observó *in vivo* e *in vitro* como la sobreexpresión de p62/SQSTM1 reducía las agregaciones citosólicas y la apoptosis celular inducida por la PrP^{Sc} [52].

3 Objetivos

En este proyecto, como objetivo general se plantea estudiar la inducción de la autofagia en ratones Tg338 infectados con scrapie para determinar la idoneidad de este modelo para afrontar futuras investigaciones dirigidas a la regulación de la autofagia en el estudio de las Enfermedades Espongiformes Transmisibles.

Los objetivos parciales propuestos han sido:

1. Estudiar la expresión génica de una batería de marcadores involucrados en el control de la autofagia en médula espinal cervical de ratones Tg338 inoculados con scrapie y sus correspondientes controles en distintas fases de la enfermedad.
2. Determinar la inducción de autofagia en el sistema nervioso central de los ratones inoculados con scrapie mediante el análisis inmunohistoquímico de los marcadores celulares LC3-II y p62.
3. Estudiar la posible relación entre los marcadores de autofagia y las lesiones características de las EETs, espongiosis y acumulación de PrP^{Sc}.

4 Material y métodos

4.1. Muestras

Se estudiaron cortes de encéfalo de ratones Tg338 obtenidos del banco de tejidos del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes (CIEETE) de la Universidad de Zaragoza. Las características de este modelo de ratón aparecen descritas en el apartado 2.1.2. Estos ratones fueron inoculados intracerebralmente con un inóculo elaborado a partir de encéfalo de ratón previamente infectado con scrapie (en los que se produjo el salto de la barrera de especie oveja-ratón) entre los 47 y 53 días de vida [54]. En concreto, se trabajó con muestras fijadas en formol e incluidas en parafina de un total de 20 ratones hembra clasificados en cuatro grupos: 6 inoculados con scrapie y signos clínicos de la enfermedad (C), 6 controles de la fase clínica (CC), 4 inoculados con scrapie sin sintomatología clínica (P) y 6 controles de la fase preclínica (CP). En la Tabla II del anexo se describe el número de días transcurridos tras la inoculación hasta el sacrificio de los animales (DPI) y la edad de los mismos en el momento del sacrificio. Además, se usaron muestras de RNA total de la médula espinal cervical de dichos animales para el estudio de expresión génica.

4.2. Lesiones histopatológicas

Para determinar las lesiones histopatológicas características de scrapie (espongiosis y depósitos de PrP^{Sc}) en el modelo murino se emplearon una serie de técnicas de análisis histopatológico e inmunohistoquímico en cortes histológicos de encéfalo de ratón incluido en parafina de 4µm de grosor.

4.2.1. Tinción con hematoxilina y eosina

Para la tinción de los cortes, se realizó previamente un proceso de desparafinado empleando xilol y alcoholes al 100%, 96% y 70%. Posteriormente, se procedió a la tinción con hematoxilina, inmersión en alcohol ácido y tinción con eosina siguiendo protocolos estándar.

4.2.2. Determinación de PrP^{Sc} mediante PET Blot

Las muestras de encéfalo de ratón incluidas en parafina fueron cortadas en secciones de 4-5µm de grosor con el micrótopo (Shandon Finesse). Se realizó la técnica utilizando tejido de 12 ratones (1CP, 4 P, 1 CC, 4 C) distribuidos en dos membranas de nitrocelulosa de 0,45µm. Tras el secado en la estufa a 37°C se desparafinaron y rehidrataron los tejidos con tolueno, isopropanol, Alcohol 96% y 80%, agua, tampón de lavado (H₂O destilada+0,05% Tween 20) y TBST (Tris Buffered Saline+0,05% Tween 20). A continuación, las muestras fueron digeridas con proteinasa K a 250µg/ml en TBS (Dako) + Brij 35P (Sigma) al 0,1% 2 h al baño María (56°C). Las membranas se lavaron con TBST y posteriormente se desnaturalizaron las proteínas con tiocianato de guanidina 3M (Sigma) en TBS, ambos en agitación rápida. Después, las membranas se volvieron a lavar añadiendo leche desnatada al 1% y se saturaron con TBST+BSA (Sigma) al 0,2% en agitación lenta. Las membranas se dejaron en esta solución de

bloqueo toda la noche y se incubaron 1h con el anticuerpo primario (monoclonal de ratón Sha31SPI Bio), dilución 1:8000 en tampón de saturación (15mL por membrana). Tras 3 series de lavado con TBST+leche 1%, se incubaron 1h con el anticuerpo secundario, un anticuerpo policlonal de cabra anti ratón conjugado con fosfatasa alcalina (AP), dilución 1:500 en tampón de saturación. Posteriormente se realizaron 5 lavados y se ajustaron las membranas a pH alcalino con TBS + 50mM de MgCl₂ anhidro. Por último, para el revelado de la señal se empleó NBT/BCIP (nitroazul de tetrazolio, Sigma) (un comprimido en 10ml de H₂O destilada) durante 45 min. Las membranas se conservaron en estufa a 37°C hasta su posterior análisis.

4.3. Estudios de expresión génica

Se analizó la expresión de seis genes (*Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* y *Gas5*), empleando como genes normalizadores *Sdha* y *H6pd*. Para ello, en primer lugar se realizó la retrotranscripción del mRNA (200 ng) utilizando el kit qScriptTM cDNA Supermix (Quanta BiosciencesTM) y siguiendo las recomendaciones del fabricante. Posteriormente se analizaron las muestras mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

4.3.1. qPCR

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos. Se estudiaron las muestras de ratones clínicos y sus controles primero y posteriormente, las de los preclínicos y sus respectivos controles. En ambas reacciones se añadieron controles negativos de amplificación en el que el cDNA se sustituyó con H₂O. La qPCR se realizó en un volumen final de 5 µL formado por 2,75 µL de mezcla de amplificación y 2,25 µL de cDNA diluido 1:7. Cada mezcla de amplificación contenía 2,5µl de TaqMan Master y 0,25µl de cebadores y sondas específicas para los genes *Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62*, *Gas5*, *Sdha* o *H6pd*. Los ensayos específicos de ThermoFisher para cada gen se muestran en el anexo (Tabla III). Cada muestra de mRNA se amplificó por triplicado. En cada placa se analizaron 4 animales (columnas) para los seis genes de estudio y los dos genes normalizadores (filas).

La qPCR se llevó a cabo en un termociclador StepOne (Applied Biosystems) siguiendo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 95 °C durante 20 s seguida de 40 ciclos de dos temperaturas, 95 °C 1 s y 60 °C durante 20 s.

4.4. Determinación inmunohistoquímica de marcadores de autofagia

Para determinar la expresión de las proteínas LC3-II y p62, consideradas marcadores de autofagia, se emplearon una serie de técnicas inmunohistoquímicas en cortes histológicos de encéfalo de ratón incluidos en parafina.

El procedimiento inmunohistoquímico empleado tanto para LC3-II como para p62 se inició con un proceso de desparafinado de las muestras similar al descrito en el apartado 2.2.1.

En el caso de LC3-II, a este proceso le siguió un desenmascarado de epítomos mediante la aplicación de un pretratamiento térmico en la autoclave (10 min a 121 °C). Después del desenmascarado e inmersión en tampón de lavado (H₂O destilada+0,05% Tween 20) se

montaron los portas con los cortes en los soportes donde se realizó el resto del proceso y se bloqueó la peroxidasa endógena cubriendo la muestras con Peroxidase blocking solution (Dako). Tras lavar con tampón de lavado tres veces, se incubaron las muestras con el anticuerpo MAP-LC3 β a una dilución 1:200 (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 h a temperatura ambiente. La omisión del anticuerpo primario fue utilizada como control de tinción no específica. A continuación, se lavaron las preparaciones e incubaron con el sistema Envision (Dako) anti-ratón conjugado con HRP (Horse raddish peroxidase, peroxidasa de rábano), seguido por nuevos lavados. Finalmente se añadió el sustrato diaminobenzidina (DAB) 10 min y se tiñó con hematoxilina durante 40 s. Las muestras se deshidrataron y montaron para su posterior análisis. En el caso de p62 se realizó la misma técnica inmunohistoquímica descrita para LC3-II, pero en este caso el desenmascarado de los epítomos se realizó aplicando un tratamiento con calor a una temperatura de 96 °C durante 20 min en Tris EDTA a pH 9 (EnVision Flex target retrieval solution high pH 50x) en el módulo de pretratamiento de tejidos PTLINK PT100 (DAKO). Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo anti-p62 humano (Enzo Life Sciences) a una dilución 1:200 durante 1 h a temperatura ambiente, y el sistema Envision anti-conejo (Dako) conjugado con HRP.

4.5. Análisis de datos

El grado de lesión esponjiforme, el depósito de prión y el inmunomarcaje para los marcadores de autofagia se valoraron de forma semi-cuantitativa otorgando valores de 0 a 5, dependiendo de la extensión de la lesión y la intensidad de la misma. Se analizaron 8 áreas del encéfalo de los distintos animales: corteza frontal (Cf); corteza talámica (Ct); área septal (As); hipocampo (Hc); tálamo (T); hipotálamo (Ht), mesencéfalo (Mes), cerebelo (Cblo) y médula oblongada (Mo).

La valoración se realizó con investigadores del Centro de Investigación en Encefalopatías y Enfermedades Transmisibles Emergentes especialistas en este tipo de patologías. Las diferencias entre grupos de animales inoculados y sus controles se establecieron con el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney. Se consideró significativo un valor de $P < 0.05$. El grado de lesión o marcaje global en el encéfalo se calculó como la media de los valores otorgados a cada área. Las diferencias en este caso muestran una distribución normal y se analizaron con el test t de Student. La normalidad de los datos se confirmó con el test Saphiro-Wilk.

Para el análisis de datos de la expresión génica se siguió el método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ [54] empleando el software Excel (Microsoft). Las diferencias entre grupos se estimaron con el test t de Student, considerándose un valor estadísticamente significativo con $P < 0.05$.

5 Resultados y discusión

5.1. Lesiones

Las lesiones asociadas a scrapie, espongiosis y vacuolización, fueron evaluadas en Cf, Ct, As, Hc, T, Ht, Mes, Mo, Cblo de los ratones infectados y sus respectivos controles como ya se ha comentado.

En la evaluación de la degeneración esponjiforme de las muestras tratadas con la tinción hematoxilina-eosina (Figura 4), los controles no presentaron tejido afectado, mientras que los animales infectados en fase preclínica comenzaron a mostrar un aumento en la vacuolización estadísticamente no significativo. Por último, en los animales en fase clínica todas las regiones mostraban abundante espongiosis, a excepción del Cblo. Al comparar estos animales con sus controles se observaron diferencias significativas en Ht, T, Hc, Mo y As ($P < 0,01$ Mann-Whitney test) y en Mes, Cf, Ct ($P < 0,05$ Mann-Whitney test). El perfil lesional de espongiosis se muestra en la Figura 5.

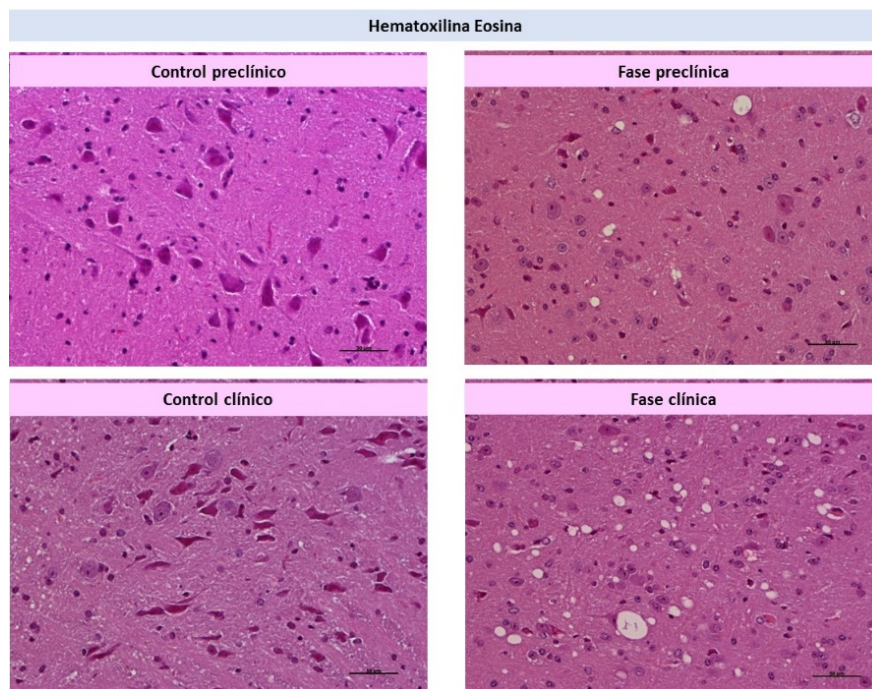


Figura 4. Tinción con hematoxilina-eosina de la médula oblongada de ratones Tg338 en distintas fases de la enfermedad y sus controles.

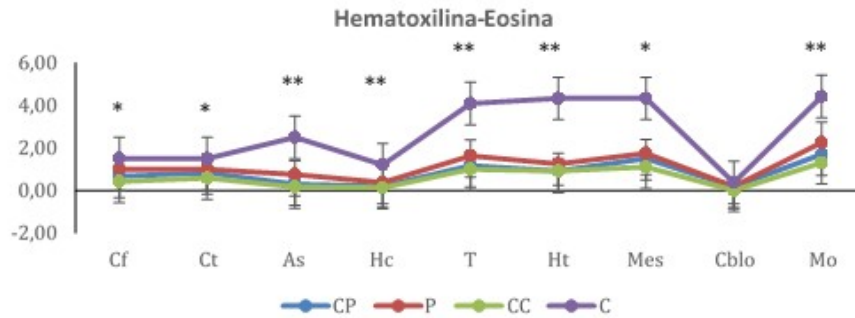


Figura 5. Perfil de espongirosis en ratones Tg338 inoculados con scrapie en fase preclínica (P), clínica (C) y sus respectivos controles (CP y CC). La gráfica muestra los valores semi-cuantitativos de espongirosis medios en cada área y la desviación estándar. Áreas analizadas: corteza frontal (Cf), corteza talámica (Ct), área septal (As), hipocampo (Hc), tálamo (T), hipotálamo (Ht), mesencéfalo (Mes), cerebelo (Cblo), médula oblongada (Mo). Significación calculada con el test de Mann-Whitney (* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$) entre los ratones inoculados con scrapie y sus controles.

Por otro lado, la determinación de los agregados proteicos de PrP^{Sc} mediante la técnica de PET Blot confirmó la presencia de PrP^{Sc} en los animales inoculados con scrapie en fase preclínica en 3 de los 4 ratones estudiados y en todos los animales en fase clínica. En el grupo de animales preclínicos las áreas con valoración positiva (Cf, As, Mes, Cblo e Ht) variaron según el individuo. Aunque la acumulación no era demasiado elevada comenzaban a observarse los primeros depósitos de proteína. Finalmente, los ratones infectados en fase clínica, a pesar de mostrar gran variabilidad dentro del grupo, presentaron depósitos de PrP^{Sc} con valoraciones significativamente superiores que los controles ($P < 0,05$ Mann-Whitney test) (Figura 7). El depósito de proteína no era uniforme en todas las áreas analizadas. Las regiones con mayor presencia de PrP^{Sc} fueron Mes, Ht, T ($P < 0,01$ Mann-Whitney test). Cabe señalar que en el modelo murino la Mo no presenta acumulación significativa de PrP^{Sc} en fase clínica, a diferencia de lo que ocurre en la enfermedad natural en ovino.

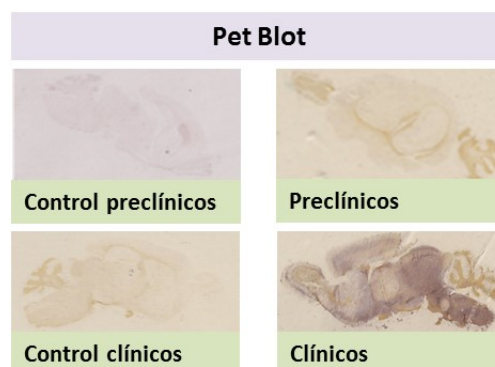


Figura 6. Técnica PET Blot. Cortes de encéfalo de ratón Tg338 en las distintas fases de la enfermedad y sus controles sobre las membranas marcadas con el anticuerpo Sha31 (SPI Bio).

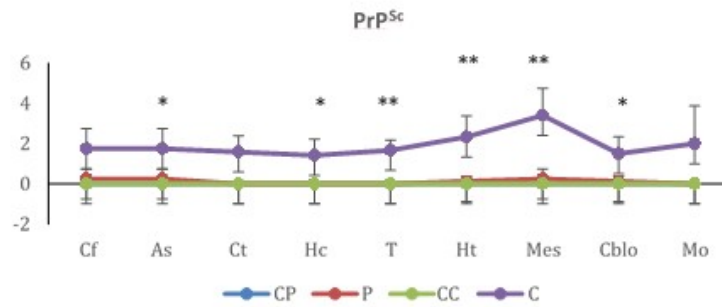


Figura 7. Perfil de PrP^{Sc} en ratones inoculados con scrapie en fase preclínica (P), clínica (C) y sus respectivos controles (CP y CC). La gráfica muestra los valores semi-cuantitativos de espongiosis medios en cada área y la desviación estándar. Áreas analizadas: corteza frontal (Cf), corteza talámica (Ct), área septal (As), hipocampo (Hc), tálamo (T), hipotálamo (Ht), mesencéfalo (Mes), cerebelo (Cblo), médula oblongada (Mo). Significación calculada con el test de Mann-Whitney (* $p < 0.05$, ** $P < 0.01$) entre los dos grupos de ratones inoculados con scrapie.

A modo de recapitulación, en general se vio que aunque en animales en fase preclínica se empezaban a detectar signos histopatológicos de scrapie, estos no fueron significativamente distintos a los controles que como se esperaba, eran negativos. En los ratones en fase clínica, por su parte, a pesar de la variabilidad, destacó la abundante degeneración esponjiforme y el acúmulo del agente patológico.

En cuanto al reducido depósito de PrP^{Sc} en Mo en los ratones Tg338, que difiere de los resultados obtenidos en scrapie clásico en ovino, podría deberse al hecho de que en las EETs el perfil de lesión cerebral está influido por las propiedades del prion causante de la infección, de la ruta de invasión cerebral y ciertos parámetros todavía desconocidos de las células del hospedador [55]. Por tanto, en nuestro modelo la médula se afectaría en etapas tardías porque la proteína prión, en lugar de llegar a través del sistema nervioso periférico y sistema linfático al SNC [19,20,21], como ocurre de forma natural en las ovejas, se ha inoculado por vía intracerebral a nivel de la corteza frontal. Además, la falta de cambios histopatológicos en cerebelo (Figura 5) coincide con el patrón lesional característico de scrapie clásico [56]. En este sentido, Le Dur A y colaboradores apoyaban la visión de que los efectos de un mismo tipo de prión son parecidos en individuos de la misma especie o sus transgénicos y sugerían que la dosis del gen que codifica para PrP^c puede influir en la evolución del prión en la transmisión homotípica [57]. Por tanto, a pesar de las diferencias comentadas, las lesiones en Tg338 son similares a las que presentan los encéfalos de animales (ovejas y cabras) infectados con scrapie clásico [56]. Por lo que los ratones Tg338 parecen ser útiles para estudiar la patogenia de la enfermedad.

5.2. Expresión génica de marcadores de autofagia

En el estudio de los genes *Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* y *Gas5* se observó que en los ratones infectados en fase preclínica la expresión no se modificó de forma significativa con respecto a

sus controles (Figura 8), lo que indicaría que la autofagia no se estaría activando en las fases tempranas de la enfermedad.

Los ratones clínicos, por su parte, presentaron una tendencia a la disminución de *Atg5* ($P=0,05$), *E2f1* ($P=0,06$ t Student test, $P<0,1$) y *Fbxw7* ($P=0,06$ t Student test, $P<0,1$) (Figura 9). La regulación negativa de *Atg5* en nuestro modelo murino coincide con lo observado en ovejas con scrapie [58].

Por otro lado, un estudio sobre la expresión de FBXW7, que se relaciona con la ubiquitinización de MTORC1 y la fosforilación de AMPK (Figura 2), sugiere que la infección priónica incrementa la autofagia y propone que este mecanismo celular podría considerarse como un mecanismo de inmunidad innata para degradar la PrP^{Sc} y mantener la homeóstasis célula-prión. Por lo que si su expresión se ve reducida, implicaría una disminución proporcional del proceso autofágico.

Estudios recientes sugieren que la autofagia mantiene las células vivas y tienen un efecto protector contra la neurodegeneración general, por lo que se asocia con un proceso neuroprotector en Alzheimer, enfermedad de Huntington y otras patologías [59]. Sin embargo, Moon y colaboradores sugieren lo contrario, proponiendo que la proteína priónica induciría la autofagia que, a su vez, desencadenaría la muerte neuronal en enfermedades priónicas [60]. En conclusión, a pesar de las dudas que se plantean acerca de este mecanismo, la regulación negativa de los tres genes de nuestro estudio parece indicar que al avanzar el curso de la enfermedad y el aumento de las lesiones que esta misma ocasiona, se produce un bloqueo o regulación negativa del proceso autofágico.

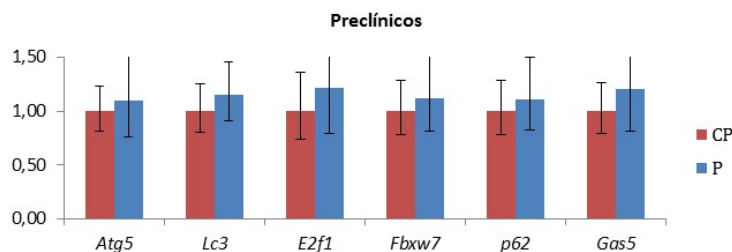


Figura 8. Perfiles de expresión de los genes *Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* y *Gas5* en médula espinal cervical de ratones Tg338 inoculados con scrapie en fase preclínica (P) y sus controles (CP). Las barras representan el valor $2^{(-\Delta\Delta Ct \pm SD)}$ en animales preclínicos inoculados y controles.

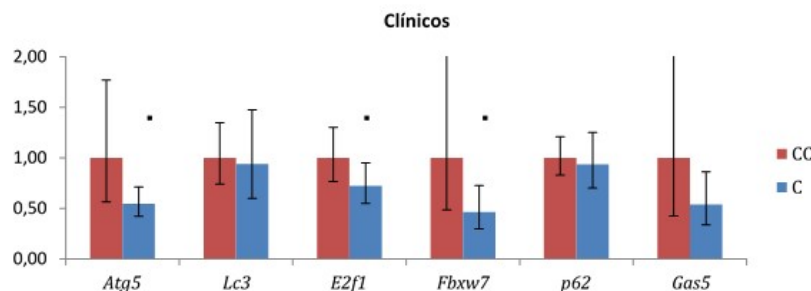


Figura 9. Perfiles de expresión de los genes *Atg5*, *Lc3*, *E2f1*, *Fbxw7*, *p62* y *Gas5* en médula espinal cervical de ratones Tg338 inoculados con scrapie en fase clínica (C) y sus controles (CC). Las barras representan el valor $2^{(-\Delta\Delta Ct \pm SD)}$ en animales clínicos inoculados y

controles. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas con el test *t* Student ($\ast p < 0.1$, tendencia a la significación)

5.3. Determinación de la autofagia mediante inmunohistoquímica: marcadores LC3-II y p62

MAP-LC3 se considera el marcador más indicado de la presencia de autofagosomas que se forman durante el proceso de autofagia. Esta proteína está constituida por dos subunidades: MAP-LC3 α y MAP-LC3 β y puede encontrarse en el citosol (LC3-I) o en la membrana del autofagosoma (LC3-II). El anticuerpo empleado en este trabajo detecta la proteína de membrana subunidad β , MAP-LC3 β -II [41]. Para abreviar nos referiremos a este compuesto como LC3-II.

La distribución tisular de LC3-II fue muy variable (Figura 11). No se observaron diferencias significativas en los valores semi-cuantitativos de inmunohistoquímica entre grupos en ninguna de las zonas analizadas, lo que corrobora los estudios previos sobre scrapie y autofagia en ovino, como se describe en el artículo pendiente de publicación del grupo de investigación que coordina dicho Trabajo de Fin de Grado [49]. Sin embargo, aunque la valoración media de LC3-II en el encéfalo no difería de forma significativa entre los animales inoculados y sus controles, el ligero aumento de esta proteína en los animales con scrapie preclínico y la disminución en los animales con signos clínicos de scrapie hizo que la diferencia entre estos grupos fuera significativa ($P=0,043$ con *t* Student). En Mo también se apreciaba una ligera disminución pero no fue significativa (Figura 12). En este sentido, en otras enfermedades neurodegenerativas como la esclerosis múltiple, LC3-II disminuye al progresar la enfermedad en ratones [60] por lo que se ha propuesto que la deficiencia en autofagia, al menos en parte, contribuía a la lesión neural.

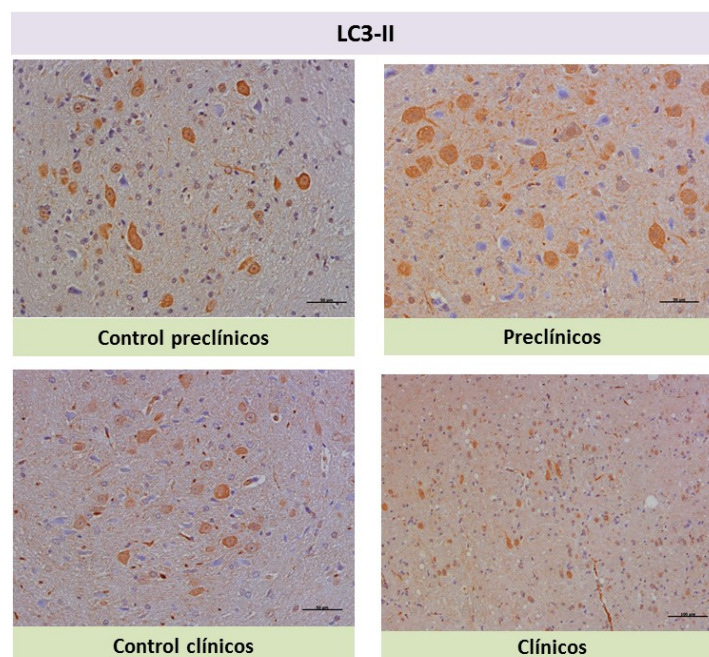


Figura 10. Inmunohistoquímica de LC3-II. Mo de cortes de encéfalo de ratón Tg338 en las distintas fases de la enfermedad y sus controles respectivos.

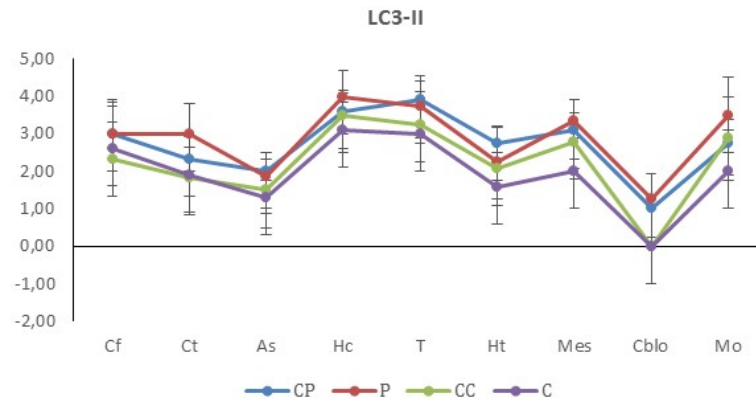


Figura 11. Perfil inmunohistoquímico de LC3-II en ratones inoculados con scrapie en fase preclínica (P), clínica (C) y sus respectivos controles (CP y CC, respectivamente). La gráfica muestra los valores semi-cuantitativos de LC3-II medios en cada área (corteza frontal (Cf), corteza talámica (Ct), área septal (As), hipocampo (Hc), tálamo (T), hipotálamo (Ht), mesencéfalo (Mes), cerebelo (Cblo), médula oblongada (Mo)) y la desviación estándar.

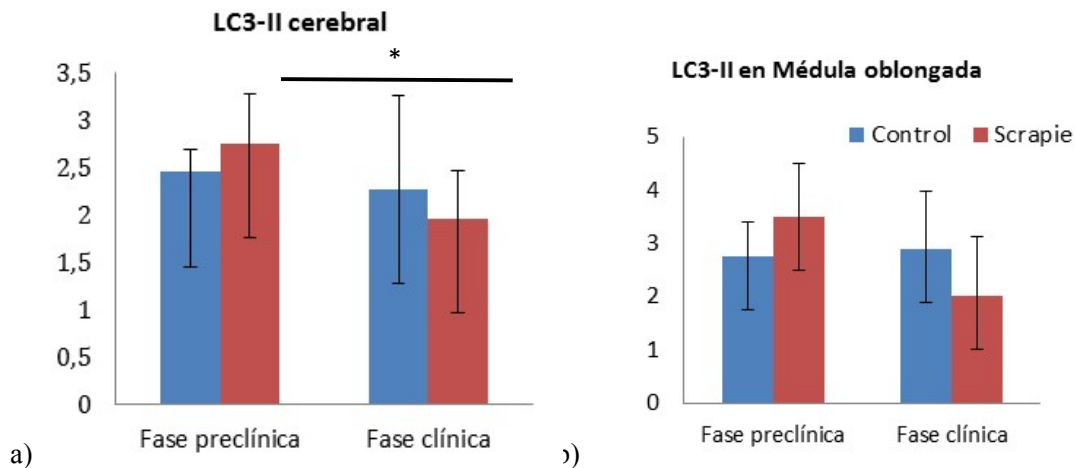


Figura 12. Perfiles inmunohistoquímicos de LC3-II que representan las diferencias entre grupos de ratones Tg338 inoculados con scrapie en fase preclínica y clínica, estos a su vez comparados con sus respectivos controles y, la desviación estándar. a) LC3-II cerebral, b) LC3-II en médula oblongada.

En cuanto a p62, también presentó un perfil variable de proteína para las distintas regiones analizadas, aunque se pudo destacar su aumento significativo en Ht ($P < 0,05$) y Ct ($P < 0,1$) entre los ratones en fase clínica, aquellos que presentan un mayor grado de lesión, y sus controles (Figura 14). Además, se observó un aumento significativo entre los animales inoculados en fase preclínica y los animales con signos clínicos de la enfermedad ($P = 0,043$ con t Student). El estudio concreto en Mo, al igual que en el caso anterior, se registró una tendencia al aumento que no llegaba a ser significativo (Figura 15). Homma y colaboradores asociaron el incremento de la expresión de p62 en cerebros y cultivos celulares infectados con priones con una reducción en la cantidad de PrP^{Sc}, sugiriendo que la activación p62 podría acelerar la depuración de PrP^{Sc} [51]. En la misma línea, Yin Xu y colaboradores relacionaron la sobreexpresión de

p62/SQSTM1 con la reducción de agregaciones citosólicas y la apoptosis celular inducida por la PrP^{Sc} [52]. En nuestro trabajo el aumento de p62 lo observamos en la fase tardía de la enfermedad, cuando los agregados de prión son mayores. Cabe preguntarse si p62 actuaría como una respuesta para la eliminación de prión o bien, se da su acumulación porque existe un fallo o bloqueo de la autofagia.

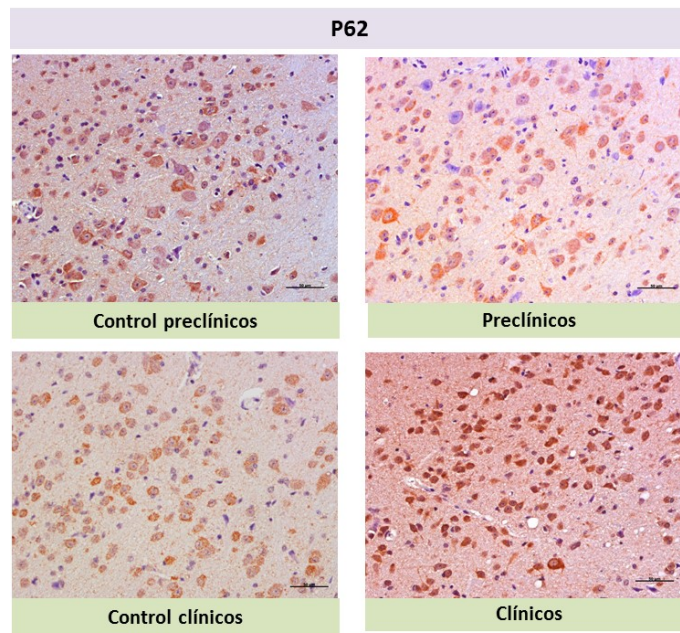


Figura 13. Inmunohistoquímica de p62. Hipotálamo (Ht) de cortes de encéfalo de ratón Tg338 en las distintas fases de la enfermedad y sus controles respectivos.

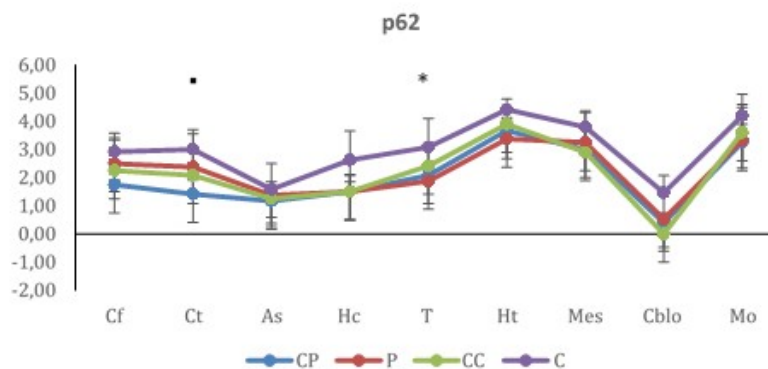


Figura 14. Perfil inmunohistoquímico de p62 en ratones inoculados con scrapie en fase preclínica (P), clínica (C) y sus respectivos controles (CP y CC, respectivamente). La gráfica muestra los valores semi-cuantitativos de p62 medios en cada área (corteza frontal (Cf), corteza talámica (Ct), área septal (As), hipocampo (Hc), tálamo (T), hipotálamo (Ht), mesencéfalo (Mes), cerebelo (Cblo), médula oblongada (Mo)) y la desviación estándar.

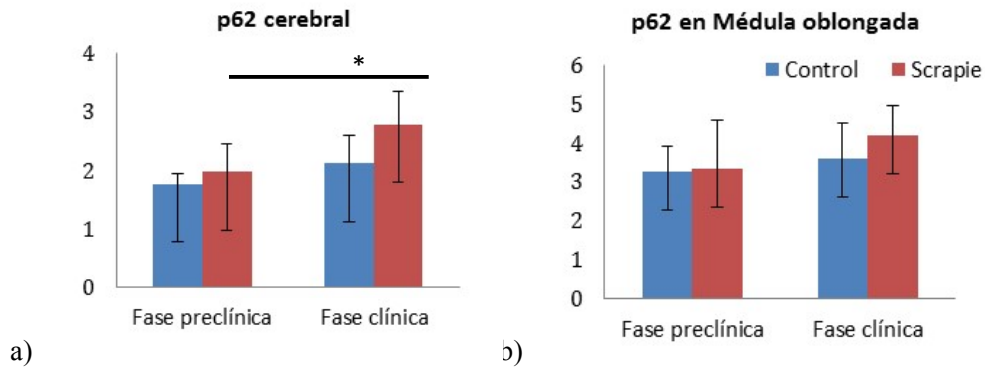


Figura 15. Perfiles inmunohistoquímicos de p62 que representan las diferencias entre grupos de ratones Tg338 inoculados con scrapie en fase preclínica y clínica, estos a su vez comparados con sus respectivos controles y, la desviación estándar. a)p62 cerebral, b)p62 en médula oblongada.

Para concluir, la disminución de LC3-II y el incremento de p62 en ratones con sintomatología clínica, junto con la disminución del gen *Atg5* en ese mismo estadio, podría indicar la inhibición del proceso de autofagia en la fase tardía de la enfermedad, lo que favorecería la replicación del prión.

6. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este Trabajo de Fin de Grado podemos obtener las siguientes conclusiones:

- El modelo murino Tg338 muestra lesiones similares a los observados en el modelo natural de scrapie clásico ovino, por lo que se puede proponer como buen modelo para el estudio de la patogenia de esta enfermedad.
- La tendencia a disminuir la expresión de diversos genes involucrados en la regulación de la autofagia en ratones infectados con scrapie con sintomatología clínica sugiere que este proceso se bloquea en estadios tardíos de la enfermedad.
- La disminución de LC3-II a nivel global en el cerebro de ratones inoculados con scrapie en fase clínica junto con el aumento de p62 en estos mismos animales corrobora la inhibición de la autofagia como un signo tardío de la enfermedad que podría facilitar la replicación del prión.
- Los resultados obtenidos en el estudio de autofagia se asemeja a los obtenidos en el modelo natural de scrapie y otras enfermedades neurodegenerativas por lo que el modelo murino Tg338 parece ser adecuado para estudiar la implicación de la autofagia en las enfermedades priónicas y su potencial modulación mediante tratamientos.

Conclusions

- Tg338 murine model shows similar lesions to those observed in the natural model of sheep scrapie, therefore these mice could be a suitable model in order to study the pathogenesis of the disease.
- The tendency to decrease the expression of various genes involved in the regulation of autophagy in scrapie-infected mice with clinical signs suggests that this process is blocked in late stages of the disease.
- Global decrease of LC3-II in the brain of inoculated mice with clinical scrapie together with the increase of p62 in the same animals corroborates the inhibition of autophagy as a late sign of disease that could facilitate the replication of prions.
- The results obtained in the autophagy study resemble those obtained in the natural model of scrapie and other neurodegenerative diseases, therefore the murine model Tg338 seems to be appropriate to study the implication of autophagy in prion diseases and its potential modulation through medical treatments.

7 Bibliografía

1. Badiola Díez J.J. Introducción. En: Badiola Díez JJ., Pumarola i Balltllé M. editores. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles. 1ª ed. Madrid: Ediciones Mayo;2010.p.142-10.
2. Gajdusek DC, Zigas. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med.* 1957Nov14;257(20):974-8.
3. Lugaresi E, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti PL, Medori R. Familial insomnia with a malignant course: a new thalamic disease. *Rev Neurol (Paris).* 1986;142(10):791-2.
4. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science.* 1968 Jul 26;161(3839):388-9.
5. Hadlow WJ, Eklund CM. Scrapie--a virus-induced chronic encephalopathy of sheep. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis.* 1968; 44:281-306.
6. Wells GA, Scott AC, Johnson CT, Gunning RF, Hancock RD, Jeffrey M, Dawson M, Bradley R. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet Rec.* 1987 Oct 31;121(18):419-20.
7. Poser CM. Notes on the history of the prion diseases. Part I. *Clin Neurol Neurosurg.* 2002 Jan;104(1):1-9.
8. Filali H., Martín-Burriel I, Harders F, Varona L, Serrano C, Acín C, Badiola J.J, Bossers A, Bolea R. Medulla oblongata transcriptome changes during presymptomatic natural scrapie and their association with prion-related lesions. Filali et al. *BMC Genomics* 2012, 13:399
9. Pérez Martos A., Filali H., Monzón Garcés M. El agente causal de las encefalopatías espongiformes transmisibles. En: Badiola Díez JJ., Pumarola i Balltllé M. editores. Encefalopatías Espongiformes Transmisibles. 1ª ed. Madrid: Ediciones Mayo;2010.p.142-10.
10. Acín C, Martín-Burriel I, Goldmann W, Lyahyai J, Monzón M, Bolea R, et al. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol.*2004; 85: 2103-2110.
11. OIE. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines, 4a ed. París: OIE, 2008.
12. Wood JLN, McGill IS, Done SH, Bradley R. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec.* 1997; 140: 167-174.
13. Wells GA, McGill IS. Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci.* 1992; 53 (1): 1-10.
14. Bruce ME1, McBride PA, Farquhar CF. Precise targeting of the pathology of the sialoglycoprotein, PrP, and vacuolar degeneration in mouse scrapie. *Neurosci Lett.* 1989 Jul 17;102(1):1-6.
15. González L, Martín S, Jeffrey M. 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.* 2003; 84 (Pt 5): 1339-1350.

16. Moh CF, Siedlak SL, Tabaton M, Perry G, Castellani RJ, Smith MA. Parafin-embedded tissue (PET) blot method: application to Alzheimer disease. *J Neurosci Methods*. 2010 Jul 15;190(2):244-7.
17. Maignien T, Lasmezas CI, Beringue V, Dormont D, Deslys JP. Pathogenesis of the oral route of infection of mice with scrapie and bovine spongiform encephalopathy agents. *J Gen Virol*. 1999; 80 (Pt 11): 3035-3042.
18. Garza MC, Fernández-Borges N, Bolea R, Badiola JJ, Castilla J, et al. Detection of PrPres in genetically susceptible fetuses from sheep with natural scrapie. *PLoS ONE*. 2011; 6 (12):e27525.
19. Mabbott NA, Bruce ME. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*. 2001; 82 (Pt10): 2307-2318
20. Beekes M, McBride PA. Early accumulation of pathological PrP in the enteric nervous system and gut-associated lymphoid tissue of hamsters orally infected with scrapie. *Neurosci Lett*. 2000; 278 (3): 181-184.
21. Race R, Oldstone M, Chesebro B. Entry versus blockade of brain infection following oral or intraperitoneal scrapie administration: role of prion protein expression in peripheral nerves and spleen. *J Virol*. 2000; 74 (2): 828-833.
22. Yalcin B1, Adams DJ, Flint J, Keane TM. Next-generation sequencing of experimental mouse strains. 2012 Oct;23(9-10):490-8.
23. Steele AD, Lindquist S, Aguzzi A. The Prion Protein Knockout Mouse- A Phenotype Under Challenge. *Prion*. 2007 Apr-Jun;1(2):83-93.
24. Castilla J; Gutierrez Adan A, Brun A, Pintado B, Ramirez MA, Parra B, Doyle D, Rogers M, Salguero FJ, Sanchez C, Sanchez-Vizcaino JM, Torres JM. Early detection of PrPres in BSE-infected bovine PrP transgenic mice.; 2003; *Arch. Virol.*; 148(4); 677-91.
25. Castilla J; Gutierrez-Adan A, Brun A, Pintado B, Parra B, Ramirez MA, Salguero FJ, Diaz San Segundo F, Rabano A, Cano MJ, Torres JM. Different behavior toward bovine spongiform encephalopathy infection of bovine prion protein transgenic mice with one extra repeat octapeptide insert mutation.; 2004; *J. Neurosci.*; 24(9); 2156-64.
26. Castilla J; Brun A, Diaz-San Segundo F, Salguero FJ, Gutierrez-Adan A, Pintado B, RamirezMA,delRiegoL,TorresJM. Vertical transmission of bovine spongiform encephalopathy prions evaluated in a transgenic mouse model;2005; *J.Virol.*;79(13); 8665-8
27. Espinosa JC; Andreoletti O, Castilla J, Herva ME, Morales M, Alamillo E, San-Segundo FD, Lacroux C, Lugan S, Salguero FJ, Langeveld J, Torres JM. Sheep-passaged bovine spongiform encephalopathy agent exhibits altered pathobiological properties in bovine-PrP transgenic mice. 2007; *J. Virol.*; 81(2); 835-43.
28. Castilla J; Gutierrez-Adan A, Brun A, Doyle D, Pintado B, Ramirez MA, Salguero FJ, Parra B, Segundo FD, Sanchez- Vizcaino JM, Rogers M, Torres JM. Subclinical bovine spongiform encephalopathy infection in transgenic mice expressing porcine prion protein. 2004; *J. Neurosci.*; 24(21); 5063-9.
29. Espinosa JC; Herva ME, Andreoletti O, Padilla D, Lacroux C, Cassard H, Lantier I, Castilla J, Torres JM. Transgenic mice expressing porcine prion protein resistant to classical scrapie but susceptible to sheep bovine spongiform encephalopathy and atypical scrapie. 2009; *Emerging Infect. Dis.*; 15(8); 1214-21.
30. Padilla D; Béringue V , Espinosa JC, Andreoletti O, Jaumain E, Reine F, Herzog L, Gutierrez-Adan A, Pintado B, Laude H, Torres JM; 2011. Sheep and goat BSE propagate

- more efficiently than cattle BSE in human PrP transgenic mice.; PLoS pathogens; 7(3); e1001319.
31. Cassard H; Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, Lugan S, Lantier I, Costes P, Aron N, Reine F, Herzog L, Espinosa JC, Beringue V, Andréoletti O. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions.; ; 2014; Nature communications; ; 5821; 25510416
 32. Cassard H; Torres JM, Lacroux C, Douet JY, Benestad SL, Lantier F, Lugan S, Lantier I, Costes P, Aron N, Reine F, Herzog L, Espinosa JC, Beringue V, Andréoletti O. Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions.; ; 2014; Nature communications; ; 5821; 25510416
 33. Le Dur A1, Béringue V, Andréoletti O, Reine F, Lai TL, Baron T, Bratberg B, Vilotte JL, Sarradin P, Benestad SL, Laude H. A newly identified type of scrapie agent can naturally infect sheep with resistant PrP genotypes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Nov 1;102(44):16031-6.
 34. e Duve C (1963) Ciba Foundation Symposium: Lysosome. In: De Reuck A, Cameron MP (eds) Little, Brown// Johannes Jungverdorben1,2 & Andreas Till1,3 & Oliver Brü stle. Induced pluripotent stem cell-based modeling of neurodegenerative diseases: a focus on autophagy. April 2017, J Mol Med.
 35. Jiang, P., and Mizushima, N. (2014). Autophagy and human diseases. Cell Res. 24, 69–79. doi: 10.1038/cr.2013.161
 36. Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. Science. 2000; 290 (5497): 1717-1721.
 37. Moltimore GE, Poso AR. Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. Annu Rev Nutr. 1987; 7: 539-564.
 38. Lum JJ, Bauer DE, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. Cell. 2005; 120 (2): 439-448.
 39. Magariños M, Pulido S, Aburto M.R, Iriarte-Rodríguez R., Varela-Nieto I. Autophagy in the Vertebrate Inner Ear. Front Cell Dev Biol. 2017 May 26;5:56.
 40. Ktistakis NT and Tooze SA. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. 2016 Trends Cell Biol 26, 624-635
 41. Tsapras P, Nezis I. P. Caspase involvement in autophagy. Cell Death and Differentiation advance online publication, 2June 2017
 42. Liberski PP, Sikorska B, Bratosiewicz-Wasik J, Gajdusek DC, Brown P. Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004 Dec;36(12):2473-90
 43. Bursch W, Hochegger K, Torok L, Marian B, Ellinger A, Hermann RS. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. J Cell Sci. 2000; 113: 1189-1198
 44. Boellaard JW, Schlote W, Tateishi J. Neuronal autophagy in experimental Creutzfeldt-Jakob's disease. Acta neuropathologica. 1989; 78: 410-418.
 45. YinXu& ChanTian& JingSun& JinZhang& KeRen& Xue-Yu Fan & Ke Wang & Hui Wang & Yu-E Yan & Cao Chen & Qi Shi & Xiao-Ping Dong. FBXW7-Induced MTOR Degradation Forces Autophagy to Counteract Persistent Prion Infection.Mol Neurobiol (2016)53:706–719

46. Kurashige J1, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Hiyoshi Y, Kamohara H, Baba Y, Mimori K, Baba H. Overexpression of microRNA-223 regulates the ubiquitin ligase FBXW7 in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2012 Jan 3;106(1):182-8.
47. Chen ZH1, Wang WT1, Huang W1, Fang K1, Sun YM1, Liu SR1, Luo XQ2, Chen YQ1. The lncRNA HOTAIRM1 regulates the degradation of PML-RARA oncoprotein and myeloid cell differentiation by enhancing the autophagy pathway. *Cell Death Differ*. 2017 Feb; 24(2):212-224.
48. Mark R. Pickard * and Gwyn T. Williams. Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes* 2015, 6, 484-499.
49. López-Pérez O, Bolea R, Filali H, Sanz-Rubio D, Otero A, Toivonen JM, Zaragoza P, Badiola JJ, Martín-Burriel I. Spatial Distribution of Autophagy Markers in the Central Nervous System of Sheep Naturally Infected by Scrapie. *Sent*.
50. Lippai M., Lyw P. *Rev.Ar*. The Role of the Selective Adaptor p62 and Ubiquitin-Like Proteins in Autophagy. *Biomed Res Int*. 2014; 2014:832704.
51. Homma T., Ishibashi D., Nakagaki T., Satoh K., Sano K, Atarashi R, Nishida N. Increased expression of p62/SQSTM1 in prion diseases and its association with pathogenic prion protein. *March*. 2014 852-8523
52. Yin Xu, Jin Zhang, Chan Tian, Ke Ren, Yu Eyan, Ke Wang, Hui Wang, Cao Chen, Jing Wang, Qi Shi, Xiao-Ping Dong. Overexpression of p62/SQSTM1 promotes the degradations of abnormally accumulated PrP mutants in cytoplasm and relieves the associated cytotoxicities via autophagy-lysosome-dependent way. *Med Microbiol Immunol* (2014) 203:73–84
53. Reggiori F. 1. Membrane origin for autophagy. *Curr Top Dev Biol*. 2006; 74: 1-30
54. Vilotte JL1, Soulier S, Essalmani R, Stinnakre MG, Vaiman D, Lepourry L, Da Silva JC, Besnard N, Dawson M, Buschmann A, Groschup M, Petit S, Madelaine MF, Rakatobe S, Le Dur A, Vilette D, Laude H. Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp. *J Virol*. 2001 Jul; 75(13):5977-84.
55. Ragagnin A1, Ezpeleta J2, Guillemain A1, Boudet-Devaud F2, Haeberlé AM1, Demais V3, Vidal C4, Demuth S1, Béringue V5, Kellermann O2, Schneider B2, Grant NJ1, Bailly Y1. Cerebellar compartmentation of prion pathogenesis. *Brain Pathol*. 2017 Mar 7.
56. van Keulen LJ1, Schreuder BE, Meloen RH, Poelen-van den Berg M, Mooij-Harkes G, Vromans ME, Langeveld JP. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol*. 1995 May; 32(3):299-308.
57. Le Dur A, Laï TL, Stinnakre MG, Laisné A, Chenais N, Rakotobe S, Passet B, Reine F, Soulier S, Herzog L1, Tilly G, Rézaei H, Béringue V, Vilotte JL, Laude H. Divergent prion strain evolution driven by PrPC expression level in transgenic mice. *Nat Commun*. 2017 Jan 23;8:14170
58. Filfan M1, Sandu RE, Zăvăleanu AD, GreșiȚă A, Glăvan DG, Olaru DG, Popa-Wagner A. Autophagy in aging and disease. *Rom J Morphol Embryol*. 2017; 58(1):27-31.
59. Moon JH, Lee JH, Nazim UM, Lee YJ, Seol JW, Eo SK, Lee JH, Park SY. Human prion protein-induced autophagy flux governs neuron cell damage in primary neuron cells 2016 May 24;7(21):29989-30002.
60. Feng X, Hou H, Zou Y, Guo L. Defective autophagy is associated with neuronal injury in a mouse model of multiple sclerosis. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017 May 20;17(2):95-103.



8 Anexos

Antecedentes. Autofagia: mecanismos moleculares

Tabla I. Proteínas involucradas en la autofagia, función e interacción entre ellas. Adaptada [53].

ATG	Otro nombre	Homólogo	Función	Interacción
Atg1	Ulk1, Ulk2		Serina treonina quinasa	Atg13,Atg1,Atg17
Atg3			Sistema de conjugación Atg8	Atg9, Atg18, Atg8
Atg4	Autofagina	Atg4A (Autofagina2) Atg4B (Autofagina1) Atg4C (Autofagina3) Atg4D (Autofagina4)	Cisteín-proteasa	Atg8
Atg5			Sistema conjugación Atg12	Atg12, Atg16L
Atg6	Beclin-1		Síntesis Ptslns-3P	Vps34, PI3K, UVRAG
Atg7			Conjugación Atg8, Atg12	Atg8, Atg3, Atg12
Atg8		MAP-LC3, GATE16, GABARAP, Atg18L	Proteína de ubiquitinación	Atg3, Atg4, Atg7
Atg9	Atg9L	Atg9L1, Atg9L2	Proteína transmembrana	Atg2
Atg10			Sistema conjugación Atg12	Atg12
Atg12			Proteína de ubiquitinación	Atg3, Atg5, Atg7, Atg10, Atg16
Atg16			Asociación con Atg5-Atg12	Atg5, Atg12

Materiales y métodos. Muestras

Tabla II. Características de los ratones modelo empleados para la obtención de muestras. Sexo, días desde la inoculación hasta el sacrificio (DPI) y edad de sacrificio (días).

ID	Animales	Sexo	DPI	Edad
1625	Preclínico control	Hembra	136	187
3214	Preclínico control	Hembra	136	187
6931	Preclínico control	Hembra	136	187
8642	Preclínico control	Hembra	136	187
9893	Preclínico control	Hembra	136	187
4024	Preclínico control	Hembra	136	187
6500	Preclínico inoculado	Hembra	136	187
7234	Preclínico inoculado	Hembra	136	187
7239	Preclínico inoculado	Hembra	136	187
2519	Preclínico inoculado	Hembra	136	187
7585	Clínico control	Hembra	191	238
6946	Clínico control	Hembra	191	238
7109	Clínico control	Hembra	191	238
8343	Clínico control	Hembra	191	238
7490	Clínico control	Hembra	191	238
6766	Clínico control	Hembra	191	238
7389	Clínico inoculado	Hembra	191	238
8136	Clínico inoculado	Hembra	162	209
8247	Clínico inoculado	Hembra	162	209
6141	Clínico inoculado	Hembra	191	238
8700	Clínico inoculado	Hembra	156	203
7110	Clínico inoculado	Hembra	158	205

Materiales y métodos. Estudios de expresión génica

Tabla III. ID de los genes de estudio en la valoración de la expresión génica.

Gen	ID
<i>Atg5</i>	11793
<i>Lc3</i>	66734
<i>E2f1</i>	13555
<i>Fbxw7</i>	50754
<i>p62</i>	14884
<i>Gas5</i>	14455
<i>Sdha</i>	66945
<i>H6pd</i>	100198



Universidad
Zaragoza

Autofagia en Enfermedades Priónicas