



Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. ABSTRACT.....	3
3. INTRODUCCIÓN.....	4
3.1. Enfermedades priónicas.....	4
3.2. Etiología.....	4
3.3. Patogenia y transmisión. ....	5
3.4. Signos clínicos del <i>scrapie</i> y lesiones.....	10
3.5. Diagnóstico.....	10
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	14
5. METODOLOGÍA.....	15
5.1. Animales.....	15
5.2. Necropsia y recogida del tejido.....	15
5.3. Protocolo IHQ.....	16
5.4. Estudio histopatológico de la presencia tisular de PDI.....	17
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	19
7. CONCLUSIONES.....	22
8. CONCLUSIONS.....	23
9. VALORACIÓN PERSONAL.....	24
10. BIBLIOGRAFÍA.....	25

## 1. RESUMEN

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas que afectan a animales y a humanos. Algunos ejemplos son la enfermedad caquetizante crónica de los cérvidos (ECC), la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (ECJ) que afecta a la especie humana, la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) o el scrapie ovino y caprino. Los individuos que las padecen presentan en su sistema nervioso central (SNC) depósitos de proteína prión patológica o PrP<sup>Sc</sup> que se acumula y provoca el desarrollo de lesiones espongiformes y muerte neuronal. Los mecanismos patogénicos que intervienen en el desarrollo de la neurodegeneración asociada a las EETs siguen sin estar claros, siendo últimamente uno de los más estudiados el estrés del retículo endoplásmico, un mecanismo que la célula activa en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas y en el que se produce una sobreexpresión de proteínas como las disulfuroisomerasas (PDIs).

El presente trabajo se basa en la realización de la técnica inmunohistoquímica (IHQ) en muestras de tejido nervioso de 18 ovejas Rasa Aragonesa, hembras y de genotipo ARQ/ARQ para el gen *PRNP*, con el fin de detectar posibles diferencias en la cantidad de la proteína PDI en el SNC de los diferentes grupos.

Las ovejas se dividieron en tres grupos de seis animales: grupo control, de individuos sanos; grupo preclínico, animales infectados de forma natural por el prión asociado al scrapie pero que no presentaban signos clínicos; y grupo clínico, ovejas infectadas también por el agente etiológico del scrapie y con signos clínicos evidentes de una fase avanzada de la enfermedad. De cada oveja se seleccionaron tres áreas encefálicas para el estudio de la acumulación de la proteína PDI: obex, tálamo y corteza frontal.

Inicialmente se valoraron las muestras mediante microscopía óptica de forma semicuantitativa, en una escala del 0 al 5 en función de la intensidad de la acumulación de la proteína. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos estudiados. Posteriormente, la intensidad del depósito de PDI se analizó de manera cuantitativa utilizando el programa informático IHC Profiler 2.0, obteniendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre los obex de las ovejas preclínicas y las ovejas control. Este hecho permite extraer la conclusión de que es posible que el aumento de la PDI en el obex sea un mecanismo patogénico inicial en respuesta al mal plegamiento de proteínas en esta área encefálica.

## 2. ABSTRACT

Prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) are a group of neurodegenerative diseases that affect animals and humans. Some examples are Chronic Wasting Disease of Cervids (CWD), Creutzfeldt-Jakob Disease (CJD) that affects humans, Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE), or sheep and goat scrapie. Affected individuals present in their central nervous system (CNS) deposits of pathological prion protein or PrP<sup>Sc</sup> that accumulates and causes the development of spongiform lesions and neuronal death. The pathogenic mechanisms involved in the development of neurodegeneration associated with TSEs remain unclear. One of the most studied is the endoplasmic reticulum stress, a mechanism that the cell activates in response to the accumulation of misfolded proteins, causing an overexpression of proteins such as disulfuroisomerases (PDIs).

The present work is based on the performance of the immunohistochemical technique (IHQ) in 18 Rasa Aragonesa female sheep brains with ARQ / ARQ genotype for the *PRNP* gene, in order to detect possible differences in the accumulation of PDI protein in the CNS of the different groups.

Sheep were divided into three groups of six animals each: controls, which were healthy individuals; preclinical animals, which were naturally infected by scrapie but still did not show clinical signs; and clinical animals, also infected by scrapie and showing clinical signs since they were in an advanced stage of the disease. From each sheep, three brain areas were selected for the study of PDI protein accumulation: obex, thalamus and frontal cortex.

Initially, samples were evaluated, by optical microscopy, in a semi-quantitative manner on a scale of 0 to 5, depending on the intensity of the accumulation of the protein. However, no significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups were obtained. Subsequently, the intensity of the PDI deposit was analyzed quantitatively using the IHC Profiler 2.0 software, obtaining significant differences ( $p < 0.05$ ) between the obex region of the preclinical sheep and the control sheep. This fact allows us to suggest that it is possible that the increase of the PDI in the obex is an initial pathogenic mechanism in response to the accumulation of misfolded proteins in this brain area.

### 3. INTRODUCCIÓN

#### 3.1. Enfermedades priónicas

Las enfermedades priónicas o encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs) son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que afectan a animales y a humanos provocando una degeneración progresiva de tipo espongiforme del sistema nervioso central (SNC), lo cual da lugar a un conjunto de síntomas nerviosos que se instauran tras un largo período de incubación (Badiola Díez & Pumarola i Batlle, 2010).

El scrapie ovino y caprino, enfermedad en la que se centra este trabajo, es la EETs que se conoce desde hace más tiempo, pues se describió por primera vez en el siglo XVIII (Badiola Díez & Pumarola i Batlle, 2010). Desde entonces, la lista de EETs que afectan a los animales ha ido creciendo, y a día de hoy se conocen también otras como la Encefalopatía Espongiforme Transmisible del Visón (ETV), la Encefalopatía Espongiforme Felina (EEF), la Encefalopatía Espongiforme de los Rumiantes Silvestres, la Encefalopatía Caquetizante Cica de ciervos y alces (ECC) o la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB), siendo esta última la más conocida y la que mayor repercusión ha tenido debido a su capacidad para transmitirse a la especie humana dando lugar a la variante de Creutzfeldt-Jakob (vECJ). Entre las encefalopatías espongiformes transmisibles humanas que se conocen figuran las distintas formas de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob, el kuru, el insomnio familiar fatal y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (Badiola Díez & Pumarola i Batlle, 2010).

#### 3.2. Etiología:

Las EETs son causadas por agentes poco convencionales denominados priones. Los priones se constituyen por una proteína anómala denominada PrP<sup>Sc</sup>, la cual se origina por la conversión anómala de una glicoproteína de membrana, la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>), la cual es codificada por el gen *PRNP* del hospedador y se encuentra de manera fisiológica en el organismo, fundamentalmente en el tejido nervioso. La diferencia entre ambas reside en la configuración espacial, un cambio de conformación que conlleva una disminución del contenido de hélice alfa de la PrP<sup>C</sup> mientras que el contenido de hoja plegable beta aumenta dando lugar a la PrP<sup>Sc</sup> patológica (Prusiner, 1982). Este hecho supuso la contradicción científica de dos creencias hasta entonces admitidas, por un lado la de que todo agente responsable de enfermedades transmisibles necesita de material genético (ADN o ARN) para conseguir que una enfermedad prevalezca en el huésped, ya que la PrP<sup>Sc</sup> es capaz de inducir que la PrP<sup>C</sup> genere nuevas moléculas de PrP<sup>Sc</sup> patológica, las cuales se van acumulando poco a poco en el tejido nervioso, produciendo una lesión característica. Por otro lado, contradijo

el axioma de que la secuencia de aminoácidos especifica la conformación biológica de una proteína, y es que en el caso de los priones parece haberse demostrado que la estructura primaria de la PrP<sup>C</sup> puede adoptar numerosas conformaciones diferentes que explican la existencia de distintas cepas priónicas (Borchelt, Scott, Taraboulos, Stahl, & Prusiner, 1990; Pan et al., 1993).

El cambio de conformación de la PrP<sup>Sc</sup> aporta además a la proteína patológica una serie de propiedades diferentes (Pan et al., 1993), entre las destacan:

- Resistencia a altas temperaturas.
- Resistencia al tratamiento con formaldehído.
- Resistencia a la radiación ultravioleta.
- Resistencia a las radiaciones ionizantes.
- Resistencia a detergentes.
- Resistencia a las proteasas, ya que estas solo logran digerirla parcialmente, dando lugar a una partícula proteica de 27-30 kD, denominada PrP<sup>res</sup>

### 3.3. Patogenia y transmisión:

Las EETs animales suelen propagarse habitualmente por infección, término ambiguo en este caso, debido a que no constituye una infección en el sentido clásico ya que el agente infectante no se reproduce a sí mismo en la célula huésped sino que induce a otra proteína a cambiar de conformación. El éxito de la "infección" dependerá de factores como la cantidad de PrP<sup>Sc</sup> que accede al organismo, la PrP<sup>C</sup> existente en el tejido, la vía de infección (habitualmente la ingestión oral), la susceptibilidad genética (existen genotipos sensibles y genotipos resistentes) o la barrera de la especie receptora (Badiola Díez & Pumarola i Batlle, 2010). Las EETs humanas tienen una etiología más diversa ya que pueden ser infecciosas como el kuru, yatrogénicas (tratamiento con hormonas de crecimiento, trasplante de médula u operaciones quirúrgicas), por consumo de alimento contaminado de origen animal, hereditarias, que se deben a mutaciones que modifican el gen de la proteína, y por último las esporádicas cuya causa aún se desconoce (Imran & Mahmood, 2011).

### Puertas de entrada del agente etiológico y neuroinvasión:

En las EETs animales la puerta de entrada habitual para el prión es la ingestión oral, tras esto el material contaminado puede entrar por diferentes puntos al organismo, no obstante, el sistema inmunitario siempre se ve implicado (Mabbott & Bruce, 2001). En el caso del scrapie

y de la EEB, los priones entran principalmente a través del tejido linfoide asociado al intestino (GALT), en este proceso las células M adyacentes a las placas de Peyer realizan un papel fundamental ya que son las encargadas de captar los priones e incorporarlos en el tejido linfoide subepitelial (Mabbott & Bruce, 2001) donde serán procesados por las células dendríticas foliculares (CDF). Así, las placas de Peyer y los ganglios de los plexos encontrados en el ileon son la primera región donde pueden observarse los depósitos de PrP<sup>Sc</sup>. Tras un tiempo variable en dicho tejido, los priones se replican y se dirigen al SNC por dos rutas principales: una directa a través del sistema nervioso periférico (bien a través de la médula espinal a nivel torácico mediante el nervio esplácnico y los ganglios mesentéricos craneal y celíaco, o a través de la médula oblongada, en el núcleo motor dorsal del nervio vago) y otra indirecta que implica la participación del sistema linforreticular (nódulos linfáticos, bazo, amígdalas) y del sistema nervioso periférico (Beekes & McBride, 2000; Mabbott & Bruce, 2001). En el caso de la enfermedad de scrapie el sistema linforreticular posee una amplia participación (van Keulen, Vromans, & van Zijderveld, 2002). De este modo los priones acaban invadiendo el SNC, siendo la médula espinal torácica y la médula oblongada a nivel del obex las áreas afectadas inicialmente y con mayor frecuencia e intensidad. El obex es generalmente la primera localización en la que aparece la vacuolización y el depósito de proteína prion patológica, en concreto el núcleo dorsal del nervio vago (Beekes & McBride, 2000; Beekes, McBride, & Baldauf, 1998; Begara-McGorum, Clark, Martin, & Jeffrey, 2000; Hamir et al., 2001; Heggebo et al., 2003; van Keulen, Schreuder, Vromans, Langeveld, & Smits, 1999). Sin embargo, tampoco se puede descartar que parte del proceso de neuroinvasión ocurra mediante la circulación sanguínea llegando la PrP<sup>Sc</sup> al encéfalo a través de los órganos circunventriculares (Aguzzi & Heikenwalder, 2006; Maignien, Lasmezas, Beringue, Dormont, & Deslys, 1999).

En la actualidad aún no se conocen en su totalidad las rutas naturales de transmisión de las EETs, si bien están aceptada la ingestión oral como principal medio de transmisión horizontal, los largos períodos de incubación que caracterizan estas enfermedades hacen que sea muy difícil relacionar los casos clínicos con sus fuentes de infección originales.

En el caso de la transmisión natural del scrapie clásico los estudios epidemiológicos sugieren que esta se lleva a cabo por la vía horizontal mediante el contacto directo entre animales o, indirectamente, mediante la contaminación del ambiente (Hoinville, 1996), siendo las principales fuentes de contaminación las heces (Maignien et al., 1999), las carcasas de animales infectados (Miller, Williams, Hobbs, & Wolfe, 2004) y las placentas (Andreoletti et al., 2002; Tuo et al., 2002). Estas últimas presentan depósitos de PrP<sup>Sc</sup> incluso en estados

preclínicos de la enfermedad, lo que sugiere que la transmisión podría tener lugar desde las madres infectadas de scrapie a su descendencia y a otros animales durante el período del parto (Race, Jenny, & Sutton, 1998).

#### Neurodegeneración:

La infección de los priones causa alteraciones tisulares en el SNC, como ya se ha mencionado, siendo las más destacadas la degeneración espongiiforme, la pérdida neuronal masiva o las alteraciones sinápticas (Castilla, Hetz, & Soto, 2004). Curiosamente, y a pesar de que la proteína prión haya accedido por el sistema nervioso periférico, la neurodegeneración únicamente aparece en el SNC (Soto, Estrada, & Castilla, 2006). Los mecanismos que dan lugar a esta neurodegeneración aún se desconocen, no obstante, la correlación topográfica y temporal entre la acumulación de priones y el desarrollo de lesiones en el SNC sugiere que su simple presencia es la causa de esta neurodegeneración (Aguzzi & Polymenidou, 2004; DeArmond & Prusiner, 1993).

En las EETs las neuronas mueren mediante distintos procesos que se conocen con el nombre de "muerte celular programada". De los diferentes tipos que se ven involucrados los dos más importantes son:

- Apoptosis o muerte celular programada de tipo I: La célula sufre una serie de alteraciones específicas reguladas por una red de proteínas altamente conservadas.
- Autofagia o muerte celular programada de tipo II: Se caracteriza por la formación de numerosas vacuolas autofágicas localizadas en el citoplasma y que se acaban fusionando con los lisosomas (Liberski, Sikorska, Bratosiewicz-Wasik, Gajdusek, & Brown, 2004).

Estos procesos conllevan la activación de complicadas cascadas génicas que suponen la síntesis y activación de nuevas moléculas, tanto es así que se piensa que el conocimiento de las proteínas implicadas en el proceso apoptótico podría facilitar futuros tratamientos en la especie humana.

Entre las causas que conducen a la muerte neuronal se han propuestos mecanismos moleculares como la pérdida de sinapsis neuronales (Cunningham et al., 2003), alteraciones en la matriz extracelular (Costa et al., 2007) o la pérdida de la función antiapoptótica de la neurona (Lyahyai et al., 2006; Lyahyai et al., 2007; Serrano et al., 2009). Sin embargo, los dos mecanismos implicados en la muerte neuronal más destacados son:



- Gliosis reactiva o neuroinflamación: Consiste en la activación de los astrocitos y la microglía. Este proceso, a pesar de activarse como respuesta al daño celular puede contribuir enormemente al proceso de neurodegeneración, tanto en el daño cerebral producido como en el desarrollo de la enfermedad (Kercher, Favara, Striebel, LaCasse, & Chesebro, 2007).
- Estrés oxidativo: Este consiste en la exposición de un organismo al oxígeno o a moléculas altamente oxidantes. El oxígeno es una molécula muy reactiva que puede ser reducida parcialmente generando radicales libres, estos presentan una elevada toxicidad debido a su capacidad de dañar diferentes componentes celulares como el ADN, lípidos o proteínas. Este hecho hace necesario que la célula disponga de mecanismos que eliminen estos radicales libres, es el caso por ejemplo de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa.

La enfermedad priónica provoca que la PrP<sup>C</sup> pierda esta capacidad antioxidante, desequilibra el metabolismo de los radicales libres y se acumulan sustancias oxidativas, lo cual abre la puerta al daño oxidativo del tejido nervioso (Brown, 2005; Milhavel et al., 2000).

En relación a lo mencionado anteriormente y centrándonos en lo que se basa este trabajo debemos mencionar un último mecanismo que aún sigue en estudio y cuya participación en la neurodegeneración asociada a las EETs aún no está del todo clara, se trata del estrés del retículo endoplásmico (RE) y las consecuencias que este puede acarrear.

En los casos de enfermedad priónica, la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> altera la homeostasis del RE, se produce un excesivo acumulamiento de proteínas mal plegadas y se da lugar al "estrés del RE". Con el objetivo de volver a restablecer el equilibrio inicial se inicia un mecanismo denominado respuesta a proteínas desplegadas (*unfolding protein response*, UPR) en la que tiene lugar una sobreexpresión de chaperonas moleculares y foldasas, como las proteínas disulfuroisomerasas (PDIs) (Haefliger et al., 2011; Rutkowski et al., 2008; Turano, Coppari, Altieri, & Ferraro, 2002) proteínas muy importante que se explicarán a continuación. La UPR es una respuesta celular cuyo fin es mejorar el plegamiento de las proteínas, reducir la tasa de producción de las mismas y aumentar la eliminación de proteínas mal plegadas a través de la vía de degradación asociada al RE (Zhang & Kaufman, 2006). Esta vía de degradación marca las proteínas dañadas para que sean eliminadas por el sistema ubiquitina-proteosoma (UPS). El UPS es un sistema que presenta la célula para catalizar la eliminación de todas aquellas proteínas que se presentan mal plegadas, y está compuesto por el proteosoma y la proteína ubiquitina. Las alteraciones en el funcionamiento del UPS también se han asociado con la

aparición de enfermedades neurodegenerativas caracterizadas por la acumulación de depósitos intracelulares de proteínas mal plegadas, como el Alzheimer (Lam et al., 2000), el Párkinson (Cook & Petrucelli, 2009), la enfermedad de Huntington (Seo, Sonntag, & Isacson, 2004) ,la esclerosis lateral amiotrófica (Cheroni et al., 2009) y las propias enfermedades priónicas (McKinnon et al., 2016). Cuando la degradación del UPS no es capaz de recuperar la homeostasis celular se produce la autofagia a través de los lisosomas como ruta alternativa para la eliminación de las proteínas (Zheng, Li, & Wang, 2009). En los casos en los que el estrés del RE se mantiene en el tiempo debido a la acumulación de proteínas, y ni la UPR ni la autofagia consiguen controlar la homeostasis proteica, la célula comienza la apoptosis mediada a través de las caspasas (Mays & Soto, 2016).

Como se ha mencionado, el plegamiento de la proteínas de la célula ocurre en gran medida en el RE, se trata de un proceso complejo puesto que en este orgánulo la modificación de las proteínas acontece tras la traducción, como ocurre en el caso de la PrP<sup>C</sup> (Schroder & Kaufman, 2005). En el plegamiento proteico que ocurre en el RE se ven involucrados tres grandes grupos de proteínas: las lectinas, las chaperonas moleculares y las foldasas (Schroder & Kaufman, 2005). Estas últimas catalizan algunos de los procesos de plegamiento, entre ellas podemos destacar las proteínas disulfuroisomerasas (PDIs)(Mays & Soto, 2016; Schroder & Kaufman, 2005) de las cuales se han observado hasta 21 tipos en el ser humano (Benham, 2012) siendo la PDIA1 (o PDI) la que mejor caracterizada está (Ge et al., 2013).

La familia de las PDIs presenta numerosas funciones celulares, actúan como chaperonas moleculares, participan en los enlaces proteicos, representan reservorios hormonales y recientemente se ha observado cómo además están implicadas en la regulación de la apoptosis (Grek & Townsend, 2014). La PDI en concreto es una proteína fundamental para el correcto plegamiento de las proteínas, ya que se encarga de formar y reorganizar los puentes disulfuro de las mismas (Ge et al., 2013), y por otro lado, la PDI también contribuye al correcto plegamiento de las proteínas actuando como una chaperona molecular y evitando la agregación de los residuos proteicos (Bottomley, Batten, Lumb, & Bulleid, 2001; Freedman, Hirst, & Tuite, 1994; C. C. Wang, 1998; Wilson, Lees, & Bulleid, 1998).

En el caso de las enfermedades priónicas ciertos estudios han demostrado que las proteínas de la familia PDI se sobreexpresan en el encéfalo de pacientes que padecen vCJD y sCJD (Hetz, Russelakis-Carneiro, Maundrell, Castilla, & Soto, 2003; Torres et al., 2015; Yoo et al., 2002) y en casos de EEB (Tang, Xiang, Terry, Kretzschmar, & Windl, 2010). Asimismo, la sobreexpresión de estas proteínas se ha observado en modelos murinos infectados con diferentes cepas priónicas

(Hetz et al., 2005; S. B. Wang et al., 2012). Otro estudio mostró que la sobreexpresión de PDI comienza en estadios tempranos de la enfermedad y aumenta progresivamente hasta las fases terminales, sugiriendo que esta enzima juega un papel complejo durante el curso de las EETs, pues en los estadios iniciales se comportaría como un factor protector eliminando las proteínas mal plegadas, mientras que en estadios terminales induciría la apoptosis celular (S. B. Wang et al., 2012).

#### 3.4. Signos clínicos y lesiones:

El scrapie (encefalopatía espongiiforme ovina y caprina) es la enfermedad prototipo de las EETs, y la que se conoce desde hace más tiempo, por lo que siempre ha sido la enfermedad modelo dentro de este grupo de enfermedades. Dependiendo de la fase de la enfermedad, los animales que la padecen presentan unos determinados signos clínicos. Así, en la etapa temprana se puede observar hipoestesia en las extremidades y alteración del estado mental. En la etapa media, los signos representativos son los mismos que los de la etapa temprana, junto con la hiporreflexia en las extremidades, la arritmia cardíaca, la presencia de prurito con pérdida de lana y la aparición del reflejo de mordisqueo. Los signos clínicos representativos para la etapa tardía son los temblores de cabeza, hiperexcitabilidad a estímulos externos, ataxia o anormalidades de la marcha y rechinar de dientes (Vargas et al., 2006).

Todos los individuos afectados por enfermedades priónicas presentan una serie de lesiones similares, entre las que podemos destacar la hipertrofia e hiperplasia de los astrocitos, la pérdida de neuronas, la formación de vacuolas en las células del sistema nervioso y en el neuropilo y la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> (Badiola Díez & Pumarola i Batlle, 2010; Prusiner, 1982).

#### 3.5. Diagnóstico:

Las técnicas de diagnóstico de las EETs se basan en la observación de las lesiones características de este grupo de enfermedades y la detección de la PrP<sup>Res</sup> patológica en el SNC, principalmente mediante técnicas inmunohistoquímicas (Badiola Díez & Pumarola i Batlle, 2010). Dado que el agente causal de las EETs carece de ácidos nucleicos es imposible utilizar las técnicas basadas en la detección del genoma, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por otra parte, la PrP<sup>Res</sup> patológica no es reconocida como extraña por el organismo, lo que provoca una nula reacción inmunitaria específica impidiendo de este modo la realización de las pruebas serológicas. Además, el agente causal no se puede aislar *in vitro* por lo que el único modo para demostrar que el agente es infeccioso es mediante la inoculación en animales de experimentación.

Hoy en día hay diferentes métodos para diagnosticar *in vivo* la enfermedad, sin embargo, ninguno permite la detección de todos los animales infectados. Esto se debe a que son métodos basados en cambios clínicos y patológicos que solo se manifiestan en las fases finales del período de incubación y el agente ha alcanzado ya el SNC (Wells, Spencer, & Haritani, 1994). Por ello, los métodos de laboratorio oficiales para diagnosticar las EETs se realizan de manera *post mortem* en muestras de tejido del SNC.

#### Examen histopatológico:

Las EETs generan lesiones visibles únicamente al microscopio y localizadas de forma exclusiva en el SNC (Wells & Wilesmith, 1995), se caracterizan por una neurodegeneración que suele ir acompañada de gliosis, degeneración y pérdida neuronal (Wells & McGill, 1992). La lesión más característica de las EETs es la vacuolización, en el caso del *scrapie* ovino esta aparece de forma más destacada en la médula espinal, el tronco del encéfalo y el tálamo. Sin embargo, y a diferencia de la EEB, hay una elevada variación en la distribución topográfica de las lesiones entre los individuos (Detwiler, 1992; Wood, McGill, Done, & Bradley, 1997). No obstante y a pesar de dicha variabilidad, el área que está afectada con mayor frecuencia e intensidad es la médula oblongada al nivel del obex, siendo generalmente el núcleo dorsal del nervio vago la primera localización en la que aparece la vacuolización (Begara-McGorum et al., 2000; Hamir et al., 2001). Cabe añadir que las lesiones vacuolares varían en intensidad siendo en algunos casos mínimas o insuficientes para confirmar el diagnóstico por lo que en muchos casos los resultados obtenidos no son concluyentes (Begara-McGorum et al., 2000; Wells et al., 1989).

#### Técnicas de detección de la PrP<sup>Sc</sup>:

Todas las EETs presentan acumulaciones de PrP<sup>Sc</sup> en el SNC, esta representa el único marcador molecular identificado asociado a este tipo de enfermedades (Prusiner, 1998). La acumulación de PrP<sup>Sc</sup> en el tejido nervioso es previa a la neurodegeneración espongiiforme (DeArmond & Prusiner, 1993; Jeffrey, Martin, Barr, Chong, & Fraser, 2001; Wells et al., 1998), este hecho permite diagnosticar animales infectados en los que las lesiones neuropatológicas son mínimas o no están presentes.

En la actualidad la mayoría de los métodos diagnósticos se basan en la detección del fragmento resistente a la proteinasa K de la PrP<sup>Sc</sup> mediante el uso de anticuerpos específicos. No todos los anticuerpos que se utilizan en el diagnóstico de las EETs discriminan entre

ambas isoformas de la proteína, por lo que previamente a la detección de la PrP<sup>Res</sup> es necesario degradar la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>), en general con proteinasa K (PK).

Técnicas inmunohistoquímicas: Son las más utilizadas para detectar *in situ* la PrP<sup>Sc</sup>, permiten determinar su presencia, como se distribuye por el tejido, su localización celular y las características morfológicas de su acumulación (Gonzalez, Martin, & Jeffrey, 2003).

Los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> pueden observarse tanto asociados a las lesiones histopatológicas como en áreas donde no se presenta vacuolización o ésta es mínima (Foster, Wilson, & Hunter, 1996; Hardt, Baron, & Groschup, 2000), destacando que en cualquier caso es en el núcleo dorsal del nervio vago y en la médula espinal torácica donde estos depósitos de PrP<sup>Sc</sup> aparecen de forma inicial (Begara-McGorum et al., 2000; Heggebo, Press, Gunnes, Gonzalez, & Jeffrey, 2002; Jeffrey et al., 2001; Ryder, Spencer, Bellerby, & March, 2001).

El diagnóstico de las EETs utilizando las técnicas IHQ se realiza identificando los patrones de inmunotinción, su distribución topográfica y su localización celular específica (Ryder et al., 2001; Wells & Wilesmith, 1995). En el caso del scrapie se han descrito diferentes tipos de patrones de inmunotinción: Intraneuronales, intragliales, estrellados, subpiales, perivasculares, subependimarios, ependimarios, lineales etc. (Gonzalez et al., 2003). No obstante, es importante destacar que ningún animal afectado por scrapie presenta todos los tipos de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> y que lo normal es observar combinaciones específicas de solo alguno de ellos (Ryder et al., 2001).

Es conveniente afirmar también que la especificidad y la sensibilidad de la técnica IHQ dependen en gran medida de la metodología realizada (fijadores y pretratamientos fundamentalmente) y de los anticuerpos utilizados (Bell et al., 1997; Hardt et al., 2000; Haritani, Spencer, & Wells, 1994). Además, es necesario llevar a cabo una metodología que permita la supresión antigénica de la PrP<sup>C</sup> (los anticuerpos utilizados para detectar la PrP<sup>Sc</sup> reconocen las dos isoformas de la proteína prion), así como un procedimiento de recuperación e incremento de la exposición de los epítomos ocultos de la PrP<sup>Sc</sup> (Hardt et al., 2000).

Como se ha mencionado anteriormente, en el caso de la enfermedad de scrapie el sistema linforreticular presenta una amplia participación (van Keulen et al., 2002), tanto es así que algunos autores apuntan que el diagnóstico de la enfermedad tomando como muestras objeto de estudio tanto la médula oblongada como el sistema linforreticular (nódulo retrofaríngeo, tonsila palatina, biopsia de tercer párpado o mucosa rectal) permitirá

diagnosticar gran parte de los casos preclínicos debido a la temprana distribución del prion en el tejido linforreticular (Dennis et al., 2009; Gonzalez et al., 2008; Langeveld et al., 2006; Monleon et al., 2005; Vargas et al., 2006), siendo esta la única manera fiable de diagnosticar la enfermedad *in vivo* (Gavier-Widen, Stack, Baron, Balachandran, & Simmons, 2005). En animales con genotipos susceptibles se ha descrito una sensibilidad del test realizado en biopsia de tejido linfoide asociado al tercer párpado y a la mucosa rectal del 85-90% (Dennis et al., 2009; O'Rourke et al., 2002). Sin embargo, esta técnica presenta limitaciones ya que existen animales infectados que únicamente presentan depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en el SNC.

Técnicas de Western blotting (WB): Se trata de una técnica muy sensible para detectar las EETs (Deslys, Lasmezas, Comoy, & Domont, 2001). La PrP<sup>Sc</sup> resiste la digestión con proteinasa K, a diferencia de la PrP<sup>C</sup> que no lo hace. Teniendo esto en cuenta, si se hiciera una digestión con proteinasa K la PrP<sup>C</sup> se degradaría totalmente, mientras que la PrP<sup>Sc</sup> mostraría cierta resistencia a la digestión (Oesch et al., 1985). La técnica WB aprovecha esta característica para detectar la PrP<sup>Res</sup> de la proteína patológica mediante una reacción específica con anticuerpos.

Es una técnica muy empleada para diagnosticar EEB o scrapie ya que permite detectar la presencia de PrP<sup>Res</sup> en aquellos casos en los que las lesiones neuropatológicas son mínimas o no hay lesiones.

Técnicas rápidas de diagnóstico: Actualmente en el mercado existen siete técnicas de diagnóstico rápido para detectar el agente causal de scrapie en el tejido nervioso de los animales infectados. El procedimiento científico en el que se basan la mayoría de estas técnicas consiste en la unión de anticuerpos específicos a la proteína PrP. En general, los anticuerpos son capaces de diferenciar conformaciones distintas de una misma proteína, y la proteína priónica (PrP<sup>Sc</sup>) difiere justamente en su conformación con la proteína celular (PrP<sup>C</sup>). Sin embargo, y en condiciones prácticas, no existen anticuerpos que reconozcan específicamente la PrP<sup>Sc</sup> y no la PrP<sup>C</sup>, por lo que resulta necesaria la purificación de la PrP<sup>Sc</sup>. En la mayoría de las técnicas rápidas, la purificación de la proteína priónica se basa en las diferencias bioquímicas entre las dos proteínas. Así, gran parte de estas técnicas se fundamentan en la digestión de la PrP<sup>Sc</sup> por enzimas proteolíticas, y en la resistencia de la PrP<sup>Sc</sup> a esta enzima. Otras técnicas se basan en propiedades de agregación de la PrP<sup>Sc</sup> cuando se realiza la extracción mediante detergentes. En todos los casos, la extracción de la PrP constituye un paso fundamental en estas técnicas rápidas. La extracción suele llevarse a cabo mediante el tratamiento del homogeneizado del sistema nervioso con detergentes.

Finalmente, todas las técnicas rápidas incluyen un paso consistente en la desnaturalización de la fracción resistente (PrP<sup>Res</sup>) de la PrP<sup>Sc</sup>, a fin de permitir su unión con el anticuerpo que reconoce PrP<sup>C</sup> o PrP desnaturalizada (Grassi, Maillet, Simon, & Morel, 2008).

#### 4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Las EETs siguen siendo a día de hoy enfermedades incurables, afectan tanto a animales como a humanos y de momento no existen ni vacunas que las prevengan ni tratamientos específicos, por lo que presentan un desenlace invariablemente mortal. Todavía no se conoce el motivo por el cual la PrP<sup>Sc</sup> logra inducir la pérdida neuronal, aunque sí se conocen las proteínas implicadas en el proceso apoptótico y autofágico. Entre las proteínas que se pueden ver implicadas en el proceso apoptótico destacamos la disulfuro-isomerasa o PDI, proteína presente en el retículo endoplásmico y en la cual se centra este trabajo.

El **objetivo principal** del trabajo es conocer mediante técnicas inmunohistoquímicas en qué medida la proteína PDI se encuentra presente en el SNC de los animales que padecen scrapie, y en qué grado está relacionada el aumento de su presencia con el estadio clínico en el que el animal se encuentra.

Por ello los **objetivos específicos** de este trabajo son:

- Aprender y adquirir práctica en la realización de la técnica de inmunohistoquímica para la detección de la proteína PDI, así como comprender los fundamentos de la técnica y sus respectivos pasos.
- Realización de la técnica inmunohistoquímica utilizando muestras de encéfalo de ovejas sanas control, clínicas (fases finales de scrapie) y preclínicas (sin signos clínicos pero positivas a biopsia rectal).
- Aprender a valorar al microscopio óptico muestras histológicas y saber valorar semicuantitativamente la tinción observada.
- Aprender a utilizar programas informáticos que valoren cuantitativamente la tinción obtenida y comparar con los resultados obtenidos en la valoración semicuantitativa, con el fin de comprobar si ambos métodos pueden correlacionarse.

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Animales:

Para este estudio se han utilizado un total de 18 ovejas de la raza Rasa Aragonesa, todas hembras y con una edad comprendida entre 1-10 años. De todas ellas, 6 eran ovejas sanas usadas como controles, otras 6 se encontraban en un estadio terminal de infección natural de scrapie y las últimas 6 se encontraban en un estadio preclínico de la enfermedad (sin signos clínicos de infección). Los animales fueron genotipados para el gen *PRNP* (Acin et al., 2004), eligiendo para el estudio aquellas ovejas con el genotipo ARQ/ARQ. Los animales se vacunaron periódicamente contra enterotoxemia producida por *Clostridium perfringens* y fueron sometidos a tratamientos antiparasitarios. Además, todos los animales eran libres de los patógenos Brucella y Maedi-Visna (Filali et al., 2013).

El diagnóstico de scrapie para las ovejas clínicas se llevó a cabo mediante la descripción de los signos clínicos asociados a la enfermedad (Vargas et al., 2006) y mediante un test rápido (Bio-Rad TeSeE) y una prueba inmunohistoquímica (IHQ) del tejido usando el anticuerpo monoclonal 6H4 (Bolea et al., 2005), confirmando la presencia de PrP<sup>Sc</sup> en la médula oblongada del tronco del encéfalo. Las ovejas preclínicas fueron testadas con fines diagnósticos mediante biopsia del tercer párpado (Vargas et al., 2006) y de la mucosa rectal (Monleon et al., 2011), confirmando la presencia de PrP<sup>Sc</sup> en el tejido linfóide. Los animales controles se seleccionaron de rebaños procedentes de regiones libres de scrapie ovino, también se les realizó a todos ellos una biopsia del tercer párpado confirmándose mediante inmunohistoquímica y el test Western Blott (Prionics® -Check WESTERN) la ausencia de PrP<sup>Sc</sup> en la médula oblongada, cerebelo, mesencéfalo, tálamo, hipotálamo y corteza frontal (Filali et al., 2013).

El estudio realizado con estos animales fue aprobado por el Comité Ético para la Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (PI02/08) y se llevó a cabo en estricta acordancia con las recomendaciones para el cuidado y el uso de animales de experimentación y de acuerdo con la Ley española (R.D. 1201/2005) (Filali et al., 2013).

### 5.2 Necropsia y recogida del tejido.

Las necropsias se llevaron a cabo inmediatamente después del sacrificio del animal. Este se realizó mediante la inyección intravenosa de pentobarbital sódico y posterior desangrado. La evaluación postmortem de los animales no reveló ningún hallazgo patológico adicional. Las muestras de tejido encefálico fueron rápidamente preservadas y procesadas de acuerdo con



las pautas establecidas de seguridad. El encéfalo fue dividido sagitalmente en dos mitades, una de ellas se introdujo en una solución de formol al 10% durante 10 días, después se incluyó en parafina de acuerdo con los procedimientos estándar para el análisis histopatológico e inmunohistoquímico. A continuación, el encéfalo fue diseccionado para aislar los tejidos más relevantes neuropatológicamente, en estos se incluyeron la médula oblongada del tronco del encéfalo, la corteza frontal del cerebro y el tálamo. Tras la inclusión del tejido nervioso en parafina se realizaron cortes de 4µm, los cuales fueron montados en portaobjetos de vidrio tratados con trietoxisilil propilamina para los posteriores tratamientos inmunohistoquímicos(Filali et al., 2013).

### **5.3 Protocolo IHQ:**

#### Desparafinado:

Lo primero que se realizó es el desparafinado de las muestras, para ello se sumergieron en xilol durante 5 minutos dos veces, después dos veces en etanol 99% durante 5 minutos, a continuación, en etanol al 96% durante 3 minutos y una sola vez y finalmente en etanol 70% durante 3 minutos y una vez. Al acabar, las muestras se depositaron en una cubeta con agua destilada. Todo el proceso se llevó a cabo en una cabina de laboratorio con flujo laminar extractor y barrera de protección.

#### Desenmascaramiento de los epítomos:

Tras el desparafinado se realizó el desenmascaramiento de los epítomos, para ello se llevó a cabo un tratamiento térmico de las muestras que permitió eliminar todas las proteínas y diferentes moléculas que pudieran dar lugar a algún tipo de reacción cruzada. Con este fin se utilizó una máquina PT-Link (DAKO) que contenía un buffer citrato de pH 6, las muestras se sumergieron en él y se mantuvieron a 96 °C durante 20 minutos. Al acabar el proceso, las muestras se dejaron atemperar 10 minutos en una cubeta con el buffer de lavado Wash buffer (tris-buffered saline+0.1% Tween 20).

#### Inmunodetección:

Todos los procesos siguientes hasta llegar a la tinción con hematoxilina se realizaron de manera automática utilizando un inmunoteñidor, el Autostainer Plus (DAKO Cytomation), este indica las medidas de cada reactivo que hay que añadir en función del número de muestras que se desea teñir.

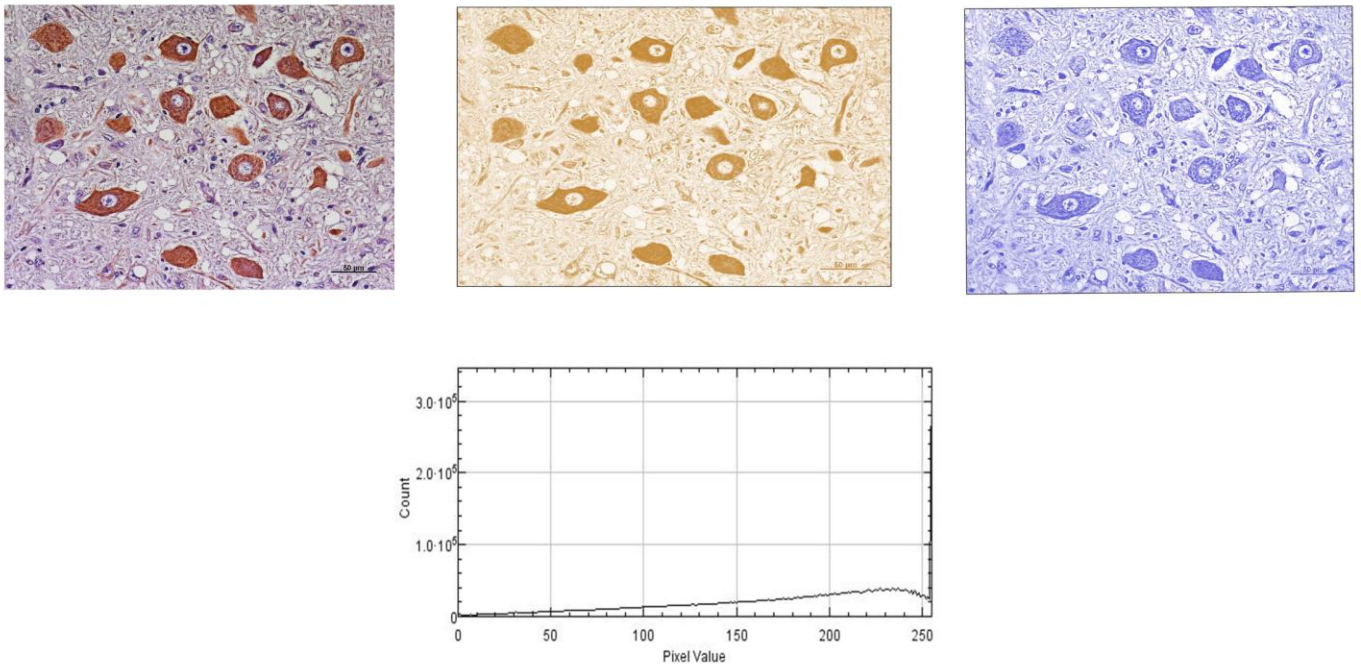
El primer paso que se realizó fue el bloqueo de la peroxidasa endógena (Peroxidase Blocking Solution, DAKO) durante 8 minutos. Este proceso es necesario debido a que posteriormente se utiliza la diaminobenzidina (DAB) como revelador, este producto químico tiene como sustrato a la peroxidasa, esta enzima se encuentra de manera fisiológica en los tejidos, sobre todo en los glóbulos rojos, por lo que es necesario su bloqueo para evitar así tinciones inespecíficas. Tras el bloqueo de la peroxidasa se lavan las muestras con Wash buffer durante 5 minutos y tres veces. Tras este paso se realizó la inmunodetección de la PDI, utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón Anti PDI (F-11) (Santa Cruz Biotechnology) a una concentración de 1:200 durante 30 minutos. Seguidamente, y tras lavar de nuevo las muestras con Wash Buffer 3 veces durante 5 minutos, para detectar al anticuerpo primario se utilizó el polímero marcado Envision anti-mouse (Envision + System, DAKO) durante 30 minutos, el cual actúa como anticuerpo secundario. Para el revelado se utilizó el sustrato DAB (DAKO). Una vez pasado el tiempo requerido paramos la reacción con agua destilada. El proceso finalizó contratiñendo las muestras utilizando la Hematoxilina (DAKO) y permitiendo de esta manera observar todas las estructuras restantes.

Una vez acabada la inmunodetección se deshidrataron las muestras sumergiéndolas en alcoholes en orden creciente de graduación, primero en etanol 70%, después etanol 96%, etanol 100% y acabando en xilol, donde permanecieron al menos 5 minutos. Una vez deshidratadas las muestras estas se montaron utilizando el pegamento DPX.

#### **5.4 Estudio histopatológico de la presencia tisular de PDI:**

Por cada oveja se seleccionaron tres muestras, una de la corteza frontal, otra del tálamo y otra del obex, es decir, 54 muestras totales. En el caso del obex se valoraron cinco núcleos diferentes: el núcleo motor dorsal del nervio vago, el del hipogloso, el cuneado lateral, el núcleo del tracto espinal del trigémino y el de la oliva. El resultado total consistía en la media de dichos núcleos. Todas las muestras se observaron al microscopio (Zeiss Axioskop 40) y se tomaron 5 fotografías de 5 campos diferentes de cada muestra (una por núcleo en el caso del obex), obteniendo así un total de 270 fotografías. Todas ellas se realizaron a 20 aumentos, con una cámara AxioCam MRC5 (Carl Zeiss Microimaging) y con un tamaño final de 4979392 píxeles por fotografía. A continuación se utilizó el programa informático IHC Profiler 2.0, con el que se evaluó la tinción que presentaba cada imagen para la proteína PDI obteniendo resultados cuantitativos de los píxeles que resultaron ser positivos y altamente positivos (Varghese, Bukhari, Malhotra, & De, 2014)(Figura 1). Finalmente, se utilizó el programa GraphPad 6.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) para realizar el análisis estadístico de los

datos y saber si existían diferencias significativas entre el número de píxeles positivos y altamente positivos de los cortes de los diferentes grupos (control, preclínicos y clínicos). Los test que se realizaron fueron ANOVA y T de Student, y en ambos casos, para asumir que las diferencias fueran significativas, se utilizó un intervalo de confianza del 95% y por tanto un valor de p menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).



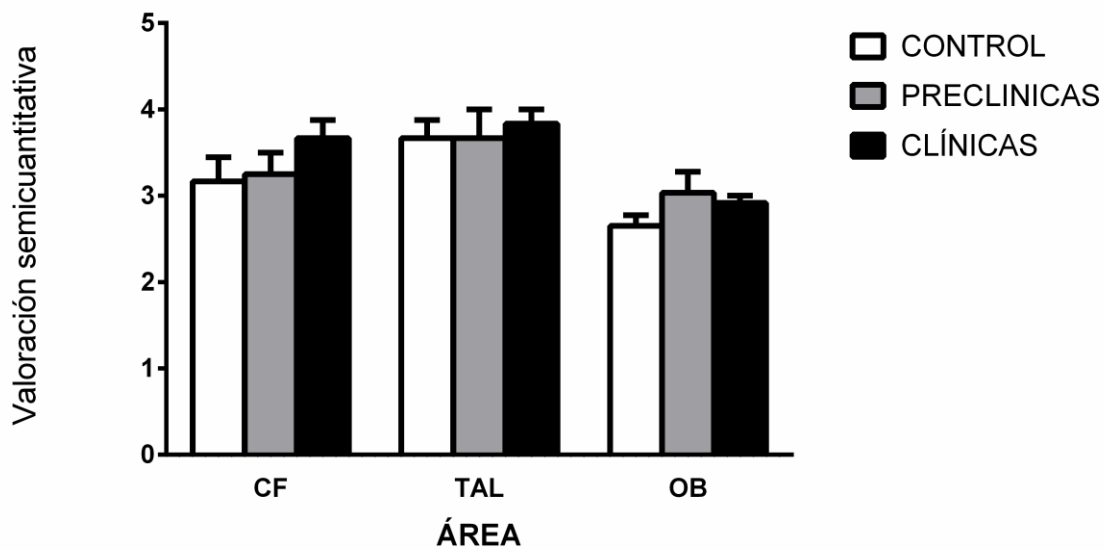
**Fig. 1:** Procesado del IHC profiler en el que se observa la descomposición de colores primarios de la fotografía de la muestra y el gráfico con los datos del conteo del número de píxeles positivos a la inmunotinción.

Además, también se realizó una valoración semicuantitativa de las 54 muestras dotando a cada una de ellas un valor comprendido entre el 0 y el 5, donde 0 significaba que el tejido no presentaba ningún tipo de tinción y 5 significaba que el tejido tenía una gran cantidad de células teñidas muy intensamente, lo cual indica una gran acumulación de la proteína PDI. El valor dado dependió de la impresión subjetiva que se obtenía al valorar las muestras al microscopio a 20X. Con los datos obtenidos se utilizó de nuevo el programa GraphPad 6.0 y el test *U* de Mann-Whitney para observar si había diferencias significativas entre grupos. De nuevo el valor que se asumió para que las diferencias fueran significativas fue de  $p < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

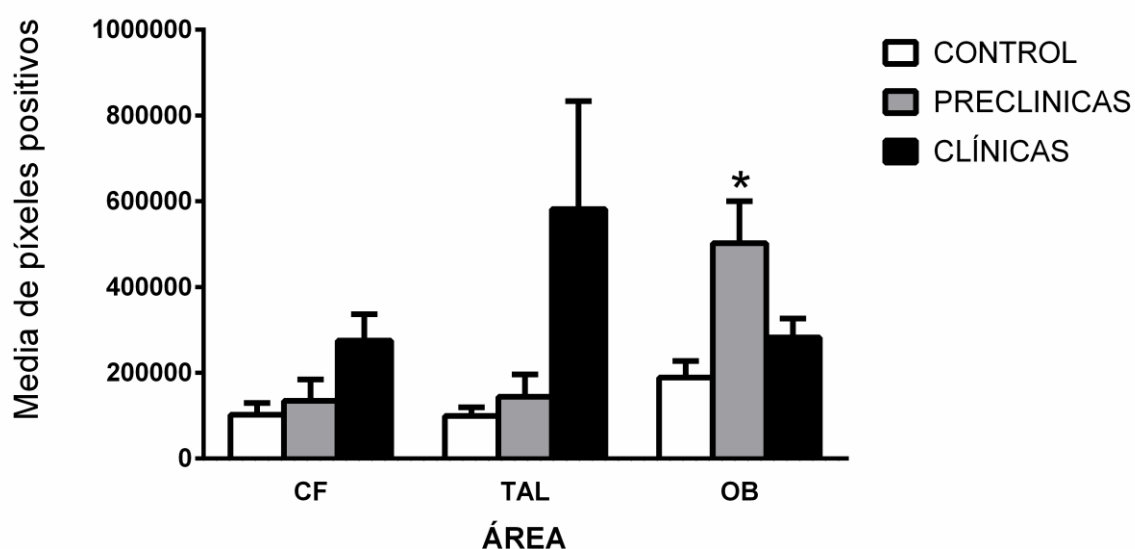
El presente estudio contaba con una muestra total de 18 ovejas, 6 de las cuales eran ovejas sanas utilizadas como controles, otras 6 eran ovejas infectadas por scrapie de forma natural, pero sin signos clínicos (preclínicas) y las últimas 6 ovejas padecían también la enfermedad de scrapie, pero en este caso presentaban signos clínicos ya que estaban en una fase terminal de la enfermedad (clínicas). De cada una de las ovejas se tomaron 3 muestras, un corte de corteza frontal, otro de tálamo y otro de obex.

Tras la valoración semicuantitativa del depósito de la proteína PDI y el análisis de los resultados obtenidos no se observó ninguna diferencia significativa entre grupos ( $p < 0,05$ ) (Figura 2), a pesar de que tanto las ovejas clínicas como las preclínicas sí que presentaban depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en el SNC así como otras diferencias significativas como la presencia de gliosis o vacuolización (Filali et al., 2013).



**Fig 2.:** Gráfico donde se muestran los resultados obtenidos en la valoración semicuantitativa de los diferentes grupos de ovejas. 0 significa que el tejido no presentaba ningún tipo de tinción y 5 significa que el tejido tenía una gran cantidad de células teñidas muy intensamente, lo cual indica una gran acumulación de la proteína PDI. Corteza frontal (CF), Tálamo (TAL) y OB (Obex).

Por ello, a la vista de los resultados semicuantitativos no podemos afirmar que se produzca una alteración en los niveles de PDI en ningún estadio de la enfermedad de scrapie natural. Sin embargo, al analizar los datos cuantitativos obtenidos por el programa informático IHC Profiler 2.0, aparecieron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre la población preclínica y la población control a nivel del obex (Figura 3).



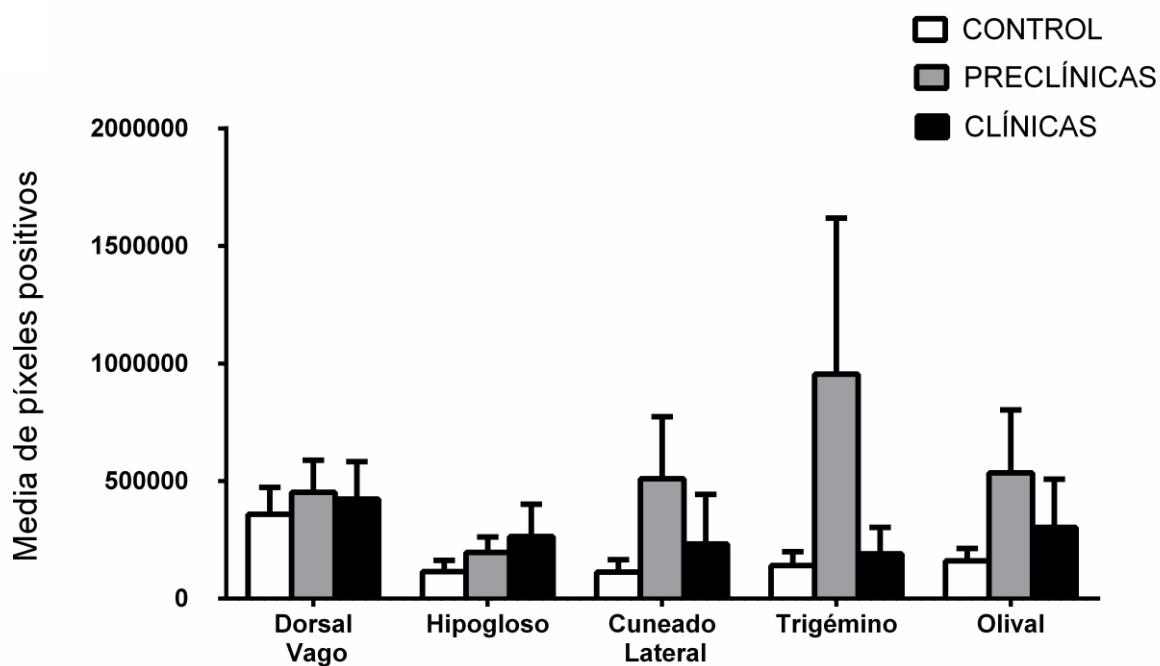
**Fig 3.:** Gráfico donde se muestran los píxeles positivos y altamente positivos obtenidos en la valoración cuantitativa del PDI por IHC Profiler. Corteza frontal (CF), Tálamo (TAL) y OB (Obex).

Dado que las diferencias significativas se observaron en esta área encefálica se decidió separar los valores cuantitativos obtenidos por cada uno de los núcleos del obex analizados. A pesar de que tras la comparación de los valores de inmunotinción obtenidos en cada uno de los núcleos por separado no se obtuvieron diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ) se observó que los animales preclínicos presentaban una mayor acumulación de PDI en casi todos los núcleos del obex estudiados (Figura 4 y Figura 5).

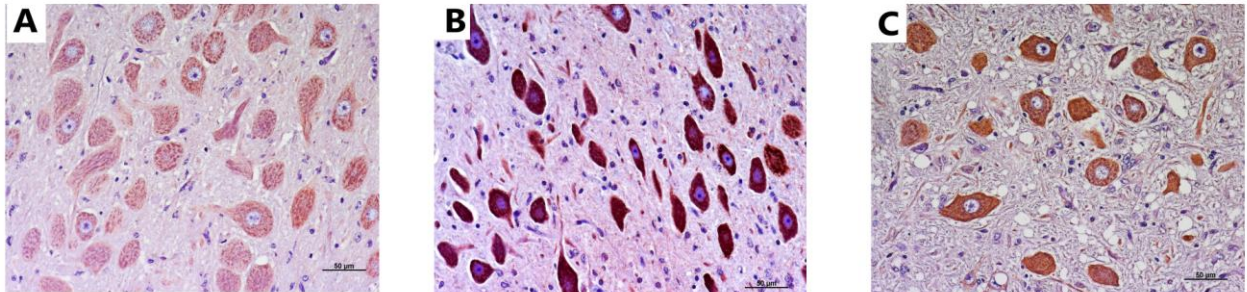
El hecho de que la significación aparezca en animales preclínicos y en zonas donde los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> se acumulan en estadios tempranos de la enfermedad (Beekes & McBride, 2000; Beekes et al., 1998; Begara-McGorum et al., 2000; Hamir et al., 2001; Heggebo et al., 2003; van Keulen et al., 1999) parece concordar con otros autores que describen un aumento de la PDI como un posible mecanismo patogénico inicial en respuesta al mal plegamiento de proteínas en este área encefálica (S. B. Wang et al., 2012; Yoo et al., 2002). La sobreexpresión

de esta proteína podría ser una respuesta temprana a la acumulación de PrP<sup>Sc</sup>, con el objetivo de intentar corregir la acumulación de esta proteína mal plegada y activar los mecanismos de degradación de proteínas.

Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en el nivel de depósito de PDI en el resto de las áreas encefálicas evaluadas (Figuras 2 y 3). Asimismo, los animales clínicos tampoco parecen mostrar una acumulación significativamente mayor de PDI con respecto a los demás grupos experimentales. Si bien sí se observaron ciertas diferencias en el grupo de los animales preclínicos, como ya se ha comentado, no parece que la acumulación de PDI sea un mecanismo patogénico fundamental en el curso del scrapie natural, sino más bien un fenómeno secundario relacionado con la acumulación de proteínas mal plegadas. Esto ya ha sido sugerido en otros estudios en los que el estrés del RE se ha evaluado en enfermedades priónicas humanas (Quaglio et al., 2011; Yoo et al., 2002).



**Fig 4.** : Gráfico donde se muestran los píxeles positivos y altamente positivos obtenidos en la valoración cuantitativa del PDI por, IHC Profiler en los diferentes núcleos del obex.



**Fig 5.** Tinción inmunohistoquímica del núcleo dorsal del nervio vago de una oveja control (A), otra preclínica (B) y otra infectada por *scrapie* (C), utilizando el anticuerpo anti-PDI. Se puede apreciar como la tinción es más intensa en el caso del cerebro del animal preclínico (B). Todas las fotografías fueron tomadas a 20X.

## 7. CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados obtenidos tras la realización de las técnicas inmunohistoquímicas para detectar PDI y posteriores valoraciones semicuantitativas con el microscopio y cuantitativas con el IHC Profiler, podemos deducir las siguientes conclusiones:

- Los niveles de PDI se mostraron aumentados tanto en animales clínicos como en los animales preclínicos, lo que podría indicar que la acumulación de depósitos de PrP<sup>Sc</sup>, una proteína mal plegada, generan una respuesta en el hospedador que lleva al estrés del RE y en consecuencia la sobreexpresión de proteínas como la PDI.
- Las diferencias significativas entre el depósito de PDI en obex de las ovejas preclínicas versus ovejas controles muestran como el aumento de la PDI parece ser un mecanismo patogénico propio de estadios tempranos de la enfermedad, en respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas.
- En las demás áreas encefálicas analizadas no se obtuvieron diferencias significativas en depósitos de PDI, lo que parece indicar que el estrés del RE no es un mecanismo patogénico fundamental en el desarrollo del scrapie natural, sino más bien un evento colateral asociado con la acumulación de proteínas mal plegadas.
- El método más adecuado, debido a su objetividad y su valor cuantitativo, resultó ser la valoración colorimétrica de las inmunohistoquímicas por medio del programa informático IHC profiler.

- La fiabilidad de los resultados depende en gran medida de la metodología que se sigue, por ello es fundamental realizar todas las técnicas con la mayor precisión posible, siendo especialmente importante la elección del anticuerpo primario en la inmunohistoquímica.

La conclusión más importante que deducimos tras las técnicas inmunohistoquímicas de detección de PDI es que la cantidad de la proteína estudiada aparece aumentada significativamente en animales preclínicos que se encuentran en estadios tempranos de la enfermedad, y en zonas del SNC donde los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> se acumulan en primer lugar. Este hecho parece sugerir que el aumento de PDI podría ser un posible mecanismo patogénico inicial en respuesta al mal plegamiento de proteínas en este área encefálica, aunque no un evento patogénico esencial para el desarrollo del scrapie.

## 8. CONCLUSIONS

After analyzing the results obtained using the immunohistochemistry technique to detect PDI, and performing the subsequent semiquantitative evaluations using the microscope, and the quantitative evaluations using the IHC Profiler, we can draw the following conclusions:

- The levels of PDI were increased in both clinical and preclinical animals, which could indicate that the accumulation PrP<sup>Sc</sup> deposits, being PrP<sup>Sc</sup> a misfolded protein, generate a response in the host that leads to stress of the RE and consequently to an overexpression of proteins such as PDI.
- The significant differences between the PDI accumulation in the obex of the preclinical sheep and the obex of the control sheep show how the increase of PDI seems to be a pathogenic mechanism characteristic of early stages of the disease in response to the accumulation of misfolded proteins.
- In the other brain areas analyzed no significant differences were found in the accumulation of PDI, which seems to indicate that ER stress is not a fundamental pathogenic mechanism in the development of natural scrapie, but rather a collateral event associated with the accumulation of misfolded proteins
- Due to its objectivity and quantitative results, the most appropriate method to perform the colorimetric assessment of immunohistochemical techniques was the IHC profiler software.
- The reliability of the results depends on the methodology followed, so it is essential to perform all the techniques as accurately as possible. The choice of the primary antibody in immunohistochemistry is especially important.



The most important conclusion we can obtain after the results obtained in the immunohistochemical analysis is that the amount of PDI appears significantly increased in preclinical animals, which are in early stages of the disease, and in areas of the CNS where PrP<sup>Sc</sup> deposits firstly appear. This fact suggests that the increase in PDI accumulation could be a possible initial pathogenic mechanism in response to the misfolding proteins in this brain area, rather than an essential pathogenic event in the development of scrapie.

## 9. VALORACIÓN PERSONAL

En primer lugar me gustaría darles las gracias a las directoras de este trabajo, a Rosa Bolea quién me ha brindado la oportunidad de poder realizarlo y a Alicia Otero quién desde el primer momento hasta el último me ha ayudado en todo lo posible a pesar del numeroso trabajo que tenía siempre encima, muchísimas gracias a las dos.

Este trabajo me ha servido para aprender mucho más de un campo tan interesante a la par de desconocido como es el mundo de las encefalopatías. He desarrollado destrezas en el laboratorio que antes no tenía y además he conseguido fotografiar con éxito muestras histológicas, logros de los que estoy orgulloso. Además he conocido más de cerca como son los mecanismos que actúan en las diferentes encefalopatías observando todo lo que queda aún por descubrir.

En conclusión puedo decir que estoy satisfecho con el trabajo realizado y con los conocimientos obtenidos, con este trabajo he visto como se cierra una etapa, como todo lo aprendido durante los años de carrera se veía reflejado en la capacidad de realizar un trabajo de manera casi autosuficiente, por ello me alegra ver como la dedicación y el esfuerzo constante acaban dando sus frutos.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., . . . Zaragoza, P. (2004). Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol*, 85(Pt 7), 2103-2110. doi:10.1099/vir.0.80047-0
- Aguzzi, A., & Heikenwalder, M. (2006). Pathogenesis of prion diseases: current status and future outlook. *Nat Rev Microbiol*, 4(10), 765-775. doi:10.1038/nrmicro1492
- Aguzzi, A., & Polymenidou, M. (2004). Mammalian prion biology: one century of evolving concepts. *Cell*, 116(2), 313-327.
- Aitken. (2007). *Disease of sheep*: Ames (Iowa): Blackwell Publishing.

- Andreoletti, O., Lacroux, C., Chabert, A., Monnereau, L., Tabouret, G., Lantier, F., . . . 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. doi:10.1099/0022-1317-83-10-2607
- Badiola Díez, J. J., & Pumarola i Batlle, M. (2010). Patogenia y transmisión. In *Encefalopatías espongiiformes transmisibles*. Barcelona; Madrid: Mayo.
- 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.
- Beekes, M., McBride, P. A., & Baldauf, E. (1998). Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol*, *79* ( Pt 3), 601-607. doi:10.1099/0022-1317-79-3-601
- Begara-McGorum, I., Clark, A. M., Martin, S., & Jeffrey, M. (2000). Prevalence of vacuolar lesions consistent with scrapie in the brains of healthy cull sheep of the Shetland Islands. *Vet Rec*, *147*(16), 439-441.
- Bell, J. E., Gentleman, S. M., Ironside, J. W., McCardle, L., Lantos, P. L., Doey, L., . . . Allen, I. V. (1997). Prion protein immunocytochemistry--UK five centre consensus report. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *23*(1), 26-35.
- Benham, A. M. (2012). The protein disulfide isomerase family: key players in health and disease. *Antioxid Redox Signal*, *16*(8), 781-789. doi:10.1089/ars.2011.4439
- Bolea, R., Monleon, E., Schiller, I., Raeber, A. J., Acin, C., Monzon, M., . . . Badiola, J. J. (2005). Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest*, *17*(5), 467-469. doi:10.1177/104063870501700511
- 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.
- Bottomley, M. J., Batten, M. R., Lumb, R. A., & Bulleid, N. J. (2001). Quality control in the endoplasmic reticulum: PDI mediates the ER retention of unassembled procollagen C-propeptides. *Curr Biol*, *11*(14), 1114-1118.
- Brown, D. R. (2005). Neurodegeneration and oxidative stress: prion disease results from loss of antioxidant defence. *Folia Neuropathol*, *43*(4), 229-243.
- Castilla, J., Hetz, C., & Soto, C. (2004). Molecular mechanisms of neurotoxicity of pathological prion protein. *Curr Mol Med*, *4*(4), 397-403.
- Cheroni, C., Marino, M., Tortarolo, M., Veglianesi, P., De Biasi, S., Fontana, E., . . . Bendotti, C. (2009). Functional alterations of the ubiquitin-proteasome system in motor neurons of a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet*, *18*(1), 82-96. doi:10.1093/hmg/ddn319
- Cook, C., & Petrucelli, L. (2009). A critical evaluation of the ubiquitin-proteasome system in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, *1792*(7), 664-675. doi:10.1016/j.bbadis.2009.01.012
- Costa, C., Tortosa, R., Domenech, A., Vidal, E., Pumarola, M., & Bassols, A. (2007). Mapping of aggrecan, hyaluronic acid, heparan sulphate proteoglycans and aquaporin 4 in the central nervous system of the mouse. *J Chem Neuroanat*, *33*(3), 111-123. doi:10.1016/j.jchemneu.2007.01.006
- Cunningham, C., Deacon, R., Wells, H., Boche, D., Waters, S., Diniz, C. P., . . . Perry, V. H. (2003). Synaptic changes characterize early behavioural signs in the ME7 model of murine prion disease. *Eur J Neurosci*, *17*(10), 2147-2155.
- DeArmond, S. J., & Prusiner, S. B. (1993). The neurochemistry of prion diseases. *J Neurochem*, *61*(5), 1589-1601.
- Dennis, M. M., Thomsen, B. V., Marshall, K. L., Hall, S. M., Wagner, B. A., Salman, M. D., . . . Sutton, D. L. (2009). Evaluation of immunohistochemical detection of prion protein in

- rectoanal mucosa-associated lymphoid tissue for diagnosis of scrapie in sheep. *Am J Vet Res*, 70(1), 63-72. doi:10.2460/ajvr.70.1.63
- Deslys, J. P., Lasmezas, C. I., Comoy, E., & Domont, D. (2001). Diagnosis of bovine spongiform encephalopathy. *Vet J*, 161(1), 1-3. doi:10.1053/tvj.2000.0530
- Detwiler, L. A. (1992). Scrapie. *Rev Sci Tech*, 11(2), 491-537.
- Filali, H., Vidal, E., Bolea, R., Marquez, M., Marco, P., Vargas, A., . . . Badiola, J. J. (2013). Gene and protein patterns of potential prion-related markers in the central nervous system of clinical and preclinical infected sheep. *Vet Res*, 44, 14. doi:10.1186/1297-9716-44-14
- Foster, J. D., Wilson, M., & Hunter, N. (1996). Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec*, 139(21), 512-515.
- Freedman, R. B., Hirst, T. R., & Tuite, M. F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. *Trends Biochem Sci*, 19(8), 331-336.
- Gavier-Widen, D., Stack, M. J., Baron, T., Balachandran, A., & Simmons, M. (2005). Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review. *J Vet Diagn Invest*, 17(6), 509-527. doi:10.1177/104063870501700601
- Ge, J., Zhang, C. J., Li, L., Chong, L. M., Wu, X., Hao, P., . . . Yao, S. Q. (2013). Small molecule probe suitable for in situ profiling and inhibition of protein disulfide isomerase. *ACS Chem Biol*, 8(11), 2577-2585. doi:10.1021/cb4002602
- Gonzalez, L., Dagleish, M. P., Martin, S., Dexter, G., Steele, P., Finlayson, J., & Jeffrey, M. (2008). Diagnosis of preclinical scrapie in live sheep by the immunohistochemical examination of rectal biopsies. *Vet Rec*, 162(13), 397-403.
- 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. doi:10.1099/vir.0.18800-0
- Grassi, J., Maillet, S., Simon, S., & Morel, N. (2008). Progress and limits of TSE diagnostic tools. *Vet Res*, 39(4), 33. doi:10.1051/vetres:2008009
- Grek, C., & Townsend, D. M. (2014). Protein Disulfide Isomerase Superfamily in Disease and the Regulation of Apoptosis. *Endoplasmic Reticulum Stress Dis*, 1(1), 4-17. doi:10.2478/ersc-2013-0001
- Haefliger, S., Klebig, C., Schaubitzer, K., Schardt, J., Timchenko, N., Mueller, B. U., & Pabst, T. (2011). Protein disulfide isomerase blocks CEBPA translation and is up-regulated during the unfolded protein response in AML. *Blood*, 117(22), 5931-5940. doi:10.1182/blood-2010-08-304485
- Hamir, A. N., Miller, J. M., Schmerr, M. J., Stack, M. J., Chaplin, M. J., & Cutlip, R. C. (2001). Diagnosis of preclinical and subclinical scrapie in a naturally infected sheep flock utilizing currently available postmortem diagnostic techniques. *J Vet Diagn Invest*, 13(2), 152-154. doi:10.1177/104063870101300209
- Hardt, M., Baron, T., & Groschup, M. H. (2000). A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol*, 122(1), 43-53. doi:10.1053/jcpa.1999.0343
- Haritani, M., Spencer, Y. I., & Wells, G. A. (1994). Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol*, 87(1), 86-90.
- Heggebo, R., Gonzalez, L., Press, C. M., Gunnes, G., Espenes, A., & Jeffrey, M. (2003). Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 84(Pt 5), 1327-1338. doi:10.1099/vir.0.18874-0
- Heggebo, R., Press, C. M., Gunnes, G., Gonzalez, L., & Jeffrey, M. (2002). Distribution and accumulation of PrP in gut-associated and peripheral lymphoid tissue of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol*, 83(Pt 2), 479-489. doi:10.1099/0022-1317-83-2-479
- 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. doi:10.1093/emboj/cdg537

- Hetz, C., Russelakis-Carneiro, M., Walchli, S., Carboni, S., Vial-Knecht, E., Maundrell, K., . . . Soto, C. (2005). The disulfide isomerase Grp58 is a protective factor against prion neurotoxicity. *J Neurosci*, *25*(11), 2793-2802. doi:10.1523/JNEUROSCI.4090-04.2005
- Hoinville, L. J. (1996). A review of the epidemiology of scrapie in sheep. *Rev Sci Tech*, *15*(3), 827-852.
- Imran, M., & Mahmood, S. (2011). An overview of human prion diseases. *Virology*, *8*, 559. doi:10.1186/1743-422X-8-559
- Jeffrey, M., Martin, S., Barr, J., Chong, A., & Fraser, J. R. (2001). Onset of accumulation of PrPres in murine ME7 scrapie in relation to pathological and PrP immunohistochemical changes. *J Comp Pathol*, *124*(1), 20-28. doi:10.1053/jcpa.2000.0423
- Kercher, L., Favara, C., Striebel, J. F., LaCasse, R., & Chesebro, B. (2007). Prion protein expression differences in microglia and astroglia influence scrapie-induced neurodegeneration in the retina and brain of transgenic mice. *J Virol*, *81*(19), 10340-10351. doi:10.1128/JVI.00865-07
- Lam, Y. A., Pickart, C. M., Alban, A., Landon, M., Jamieson, C., Ramage, R., . . . Layfield, R. (2000). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(18), 9902-9906. doi:10.1073/pnas.170173897
- Langeveld, J. P., Jacobs, J. G., Erkens, J. H., Bossers, A., van Zijderveld, F. G., & van Keulen, L. J. (2006). Rapid and discriminatory diagnosis of scrapie and BSE in retro-pharyngeal lymph nodes of sheep. *BMC Vet Res*, *2*, 19. doi:10.1186/1746-6148-2-19
- Liberski, P. P., Sikorska, B., Bratosiewicz-Wasik, J., Gajdusek, D. C., & Brown, P. (2004). Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*(12), 2473-2490. doi:10.1016/j.biocel.2004.04.016
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Monleon, E., Moreno, C., Osta, R., . . . Martin-Burriel, I. (2006). Correlation between Bax overexpression and prion deposition in medulla oblongata from natural scrapie without evidence of apoptosis. *Acta Neuropathol*, *112*(4), 451-460. doi:10.1007/s00401-006-0094-4
- Lyahyai, J., Bolea, R., Serrano, C., Vidal, E., Pumarola, M., Badiola, J. J., . . . Martin-Burriel, I. (2007). Differential expression and protein distribution of Bax in natural scrapie. *Brain Res*, *1180*, 111-120. doi:10.1016/j.brainres.2007.08.085
- Mabbott, N. A., & Bruce, M. E. (2001). The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol*, *82*(Pt 10), 2307-2318. doi:10.1099/0022-1317-82-10-2307
- Maignien, T., Lasmezas, 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. doi:10.1099/0022-1317-80-11-3035
- Mays, C. E., & Soto, C. (2016). The stress of prion disease. *Brain Res*, *1648*(Pt B), 553-560. doi:10.1016/j.brainres.2016.04.009
- McKinnon, C., Goold, R., Andre, R., Devoy, A., Ortega, Z., Moonga, J., . . . Tabrizi, S. J. (2016). Prion-mediated neurodegeneration is associated with early impairment of the ubiquitin-proteasome system. *Acta Neuropathol*, *131*(3), 411-425. doi:10.1007/s00401-015-1508-y
- Milhavet, O., McMahan, H. E., Rachidi, W., Nishida, N., Katamine, S., Mange, A., . . . Lehmann, S. (2000). Prion infection impairs the cellular response to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(25), 13937-13942. doi:10.1073/pnas.250289197
- Miller, M. W., Williams, E. S., Hobbs, N. T., & Wolfe, L. L. (2004). Environmental sources of prion transmission in mule deer. *Emerg Infect Dis*, *10*(6), 1003-1006. doi:10.3201/eid0905.020660
- Monleon, E., Garza, M. C., Sarasa, R., Alvarez-Rodriguez, J., Bolea, R., Monzon, M., . . . 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. doi:10.1016/j.vetmic.2010.06.028

- Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Bolea, R., Acin, C., Vargas, F., & Badiola, J. J. (2005). Approaches to Scrapie diagnosis by applying immunohistochemistry and rapid tests on central nervous and lymphoreticular systems. *J Virol Methods*, *125*(2), 165-171. doi:10.1016/j.jviromet.2005.01.013
- O'Rourke, K. I., Duncan, J. V., Logan, J. R., Anderson, A. K., Norden, D. K., Williams, E. S., . . . Sutton, D. L. (2002). Active surveillance for scrapie by third eyelid biopsy and genetic susceptibility testing of flocks of sheep in Wyoming. *Clin Diagn Lab Immunol*, *9*(5), 966-971.
- Oesch, B., Westaway, D., Walchli, M., McKinley, M. P., Kent, S. B., Aebersold, R., . . . et al. (1985). A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*, *40*(4), 735-746.
- Pan, K. M., Baldwin, M., Nguyen, J., Gasset, M., Serban, A., Groth, D., . . . 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.
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*, *216*(4542), 136-144.
- Prusiner, S. B. (1998). Prions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *95*(23), 13363-13383.
- Quaglio, E., Restelli, E., Garofoli, A., Dossena, S., De Luigi, A., Tagliavacca, L., . . . Chiesa, R. (2011). Expression of mutant or cytosolic PrP in transgenic mice and cells is not associated with endoplasmic reticulum stress or proteasome dysfunction. *PLoS One*, *6*(4), e19339. doi:10.1371/journal.pone.0019339
- Race, R., Jenny, A., & Sutton, D. (1998). Scrapie infectivity and proteinase K-resistant prion protein in sheep placenta, brain, spleen, and lymph node: implications for transmission and antemortem diagnosis. *J Infect Dis*, *178*(4), 949-953.
- Rutkowski, D. T., Wu, J., Back, S. H., Callaghan, M. U., Ferris, S. P., Iqbal, J., . . . Kaufman, R. J. (2008). UPR pathways combine to prevent hepatic steatosis caused by ER stress-mediated suppression of transcriptional master regulators. *Dev Cell*, *15*(6), 829-840. doi:10.1016/j.devcel.2008.10.015
- Ryder, S. J., Spencer, Y. I., Bellerby, P. J., & March, S. A. (2001). Immunohistochemical detection of PrP in the medulla oblongata of sheep: the spectrum of staining in normal and scrapie-affected sheep. *Vet Rec*, *148*(1), 7-13.
- Schroder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Biochem*, *74*, 739-789. doi:10.1146/annurev.biochem.73.011303.074134
- Seo, H., Sonntag, K. C., & Isacson, O. (2004). Generalized brain and skin proteasome inhibition in Huntington's disease. *Ann Neurol*, *56*(3), 319-328. doi:10.1002/ana.20207
- Serrano, C., Lyahyai, J., Bolea, R., Varona, L., Monleon, E., Badiola, J. J., . . . Martin-Burriel, I. (2009). Distinct spatial activation of intrinsic and extrinsic apoptosis pathways in natural scrapie: association with prion-related lesions. *Vet Res*, *40*(5), 42. doi:10.1051/vetres/2009024
- Soto, C., Estrada, L., & Castilla, J. (2006). Amyloids, prions and the inherent infectious nature of misfolded protein aggregates. *Trends Biochem Sci*, *31*(3), 150-155. doi:10.1016/j.tibs.2006.01.002
- Tang, Y., Xiang, W., Terry, L., Kretzschmar, H. A., & Windl, O. (2010). Transcriptional analysis implicates endoplasmic reticulum stress in bovine spongiform encephalopathy. *PLoS One*, *5*(12), e14207. doi:10.1371/journal.pone.0014207
- Torres, M., Medinas, D. B., Matamala, J. M., Woehlbier, U., Cornejo, V. H., Solda, T., . . . Hetz, C. (2015). The Protein-disulfide Isomerase ERp57 Regulates the Steady-state Levels of the Prion Protein. *J Biol Chem*, *290*(39), 23631-23645. doi:10.1074/jbc.M114.635565
- Tuo, W., O'Rourke, K. I., Zhuang, D., Cheevers, W. P., Spraker, T. R., & Knowles, D. P. (2002). Pregnancy status and fetal prion genetics determine PrP<sup>Sc</sup> accumulation in placentomes of scrapie-infected sheep. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(9), 6310-6315. doi:10.1073/pnas.072071199

- Turano, C., Coppari, S., Altieri, F., & Ferraro, A. (2002). Proteins of the PDI family: unpredicted non-ER locations and functions. *J Cell Physiol*, *193*(2), 154-163. doi:10.1002/jcp.10172
- van Keulen, L. J., Schreuder, B. E., Vromans, M. E., Langeveld, J. P., & Smits, M. A. (1999). Scrapie-associated prion protein in the gastrointestinal tract of sheep with natural scrapie. *J Comp Pathol*, *121*(1), 55-63. doi:10.1053/jcpa.1998.0300
- 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.
- Vargas, F., Lujan, L., Bolea, R., Monleon, E., Martin-Burriel, I., Fernandez, A., . . . Badiola, J. J. (2006). Detection and clinical evolution of scrapie in sheep by 3rd eyelid biopsy. *J Vet Intern Med*, *20*(1), 187-193.
- Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC Profiler: an open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*, *9*(5), e96801. doi:10.1371/journal.pone.0096801
- Wang, C. C. (1998). Isomerase and chaperone activities of protein disulfide isomerase are both required for its function as a foldase. *Biochemistry (Mosc)*, *63*(4), 407-412.
- Wang, S. B., Shi, Q., Xu, Y., Xie, W. L., Zhang, J., Tian, C., . . . Dong, X. P. (2012). Protein disulfide isomerase regulates endoplasmic reticulum stress and the apoptotic process during prion infection and PrP mutant-induced cytotoxicity. *PLoS One*, *7*(6), e38221. doi:10.1371/journal.pone.0038221
- Wells, G. A., Hancock, R. D., Cooley, W. A., Richards, M. S., Higgins, R. J., & David, G. P. (1989). Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec*, *125*(21), 521-524.
- Wells, G. A., Hawkins, S. A., Green, R. B., Austin, A. R., Dexter, I., Spencer, Y. I., . . . Dawson, M. (1998). Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec*, *142*(5), 103-106.
- Wells, G. A., & McGill, I. S. (1992). Recently described scrapie-like encephalopathies of animals: case definitions. *Res Vet Sci*, *53*(1), 1-10.
- Wells, G. A., Spencer, Y. I., & Haritani, M. (1994). Configurations and topographic distribution of PrP in the central nervous system in bovine spongiform encephalopathy: an immunohistochemical study. *Ann N Y Acad Sci*, *724*, 350-352.
- Wells, G. A., & Wilesmith, J. W. (1995). The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*, *5*(1), 91-103.
- Wilson, R., Lees, J. F., & Bulleid, N. J. (1998). Protein disulfide isomerase acts as a molecular chaperone during the assembly of procollagen. *J Biol Chem*, *273*(16), 9637-9643.
- 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.
- Yoo, B. C., Krapfenbauer, K., Cairns, N., Belay, G., Bajo, M., & Lubec, G. (2002). Overexpressed protein disulfide isomerase in brains of patients with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci Lett*, *334*(3), 196-200.
- Zhang, K., & Kaufman, R. J. (2006). The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*, *66*(2 Suppl 1), S102-109. doi:10.1212/01.wnl.0000192306.98198.ec
- Zheng, Q., Li, J., & Wang, X. (2009). Interplay between the ubiquitin-proteasome system and autophagy in proteinopathies. *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol*, *1*(2), 127-142.