

TESI DOCTORAL:

Estudi de la patogènia de l'encefalopatia
espongiforme bovina i de la tremolor
ovina en casos de camp



Enric Vidal Barba

Dirigida pel Dr. Martí Pumarola i Batlle
Departament de Medicina i Cirurgia Animals. Facultat de Veterinària, UAB 2006

TESI DOCTORAL

Presentada per
Enric Vidal Barba

Estudi de la patogènia de l'encefalopatia espongiforme bovina i de la tremolor ovina en casos de camp

V.I.P. del director:

Martí Pumarola i Batlle
Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 2006

Departament de Medicina i Cirurgia Animals
Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona

AND THE BEST THING YOU'VE EVER DONE FOR ME
IS TO HELP ME TAKE MY LIFE LESS SERIOUSLY
IT'S ONLY LIFE AFTER ALL

INDIGO GIRLS

T E S I D O C T O R A L :
Estudi de la patogènia de l'encefalopatia espongiforme bovina i de la
tremolor ovina en casos de camp

Í N D E X	Pàgina
INTRODUCCIÓ	7
OBJECTIUS DE LA TESI DOCTORAL.....	45
TREBALLS.....	48
Treball núm. 1: Vidal E, Márquez M, Ordoñez M, Raeber A, Struckmeyer T, Oesch B, Siso S, Pumarola M. “Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests”. 2005 <i>Journal of Virological Methods</i> . 127: 24-32.....	49
Treball núm. 2: Vidal E, Márquez M, Costa C, Tortosa R, Domènech A, Serafín A, Pumarola M. “Molecular profiling and comparison of field transmissible spongiform encephalopathy cases diagnosed in Catalunya”. 2006 Acceptat a <i>The Veterinary Journal</i>	61
Treball núm. 3: Vidal E, Márquez M, Tortosa R, Costa C, Serafín A, Pumarola M. “Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages”. 2006 <i>Journal of Virological Methods</i> . 134:15-29 -	67
Treball núm. 4: Vidal E, Bolea R, Tortosa R, Costa C, Domènech A, Monleón E, Vargas A, Badiola JJ, Pumarola M. “Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains”. 2005 Enviat a <i>Journal of Virological Methods</i>	85
DISCUSSIÓ.....	101
CONCLUSIONS.....	113
REFERÈNCIES.....	117
Resum (<i>abstract</i>)	143
Agraïments.....	147
Abreviacions.....	151

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. Context en què s'ha realitzat la tesi -----	11
1.1. La crisi de les <i>vaques boges</i> -----	11
1.2. El laboratori PRIOCAT i el pla de vigilància de les EET a Catalunya-----	11
1.3. El diagnòstic: proves ràpides i tècniques neuropatològiques-----	12
2. Les malalties priòniques-----	14
2.1. L'agent etiològic: el prió-----	14
2.1.1. La PrP cel·lular-----	16
2.1.2. Mecanismes de replicació: canvi conformacional-----	19
2.1.3. Diversitat de soques de prions i herència conformacional-----	22
2.2. Introducció a les EET humanes-----	23
2.3. Introducció a les EET animals -----	25
2.3.1. Tremolor ovina (TO) en anglès <i>scrapie</i> -----	25
2.3.2. Encefalopatia espongiforme bovina (EEB) -----	26
2.3.3. Altres-----	27
2.3.4. L'aparició dels casos atípics-----	27
2.4. La patogènia-----	28
2.4.1. El procés de neuroinvasió-----	29
2.4.2. El dipòsit de PrP-----	30
2.4.3. Les conseqüències-----	32
2.4.3.1. Resposta cel·lular-----	33
2.4.3.2. Fenòmens d'estrès oxidatiu-----	34
2.4.3.3. Alteració de les xarxes perineuronals-----	36
2.4.3.4. Alteració de la mecànica sinàptica-----	37
2.4.3.5. Mort neuronal, mecanismes-----	41
2.4.3.6. Efectes sobre les poblacions neuronals-----	42

INTRODUCCIÓ

1. Context en què s'ha realitzat la tesi:

1.1. La crisi de les *vaques boges*

El primer record que conservo de la crisi de les *vaques boges* és del curs 1995-96, quan feia primer de Veterinària. Coincideix amb l'època en què es relaciona aquesta malaltia dels bovins, que ja feia deu anys que provocava estralls al Regne Unit, amb els casos descrits en persones d'una variant de la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (vMCJ) (1), fet que va causar gran alarma social a tot la Unió Europea.

Esfereïdores imatges de vaques amuntegades i cremant, i animals *embogits* que relliscaven al fang de les seves quadres van arribar als nostres aparells televisius mentre que propiciaven comentaris com aquest: “– Mira, noi, això de les vaques boges... segur que us donarà feina!”

La predicció que encara recordo que em va fer la meua àvia en una sobretaula durant aquell curs no podia ser més encertada. Uns quants cursos més endavant escoltava com un professor d'anatomia patològica, emocionat, ens explicava la singularitat de la patogènia d'aquest tipus de malalties. El 2000, a punt d'acabar la carrera, quan feia pràctiques de camp en un escorxador de Banyoles (el Pla de l'Estany), vaig poder constatar com de rellevants eren les conseqüències d'aquella crisi. En el curt període de temps que vaig passar a l'escorxador va entrar en vigor un decret que regulava la retirada de material especificat de risc (MER) de vaques provinents de Portugal i de França.

Uns quants mesos més tard, a principis del 2001, amb el nou segle començava la meua incursió al món de les malalties prioniques. Entrava a formar part del grup de neuropatologia veterinària de la Facultat liderat pel Dr. M. Pumarola. Hi entrava becat per un projecte europeu que estudiava, justament, els mecanismes d'invasió del prió de la tremolor ovina (TO) en el sistema nerviós central de ratolins (FAIRJ-CT 98-6022).

1.2. El laboratori PRIOCAT i el pla de vigilància de les EET a Catalunya

La meua entrada al grup coincidia també amb la recent oficialització dels primers casos d'encefalopatia espongiforme bovina (EEB) a l'Estat espanyol (2). Arran de l'aparició d'aquests casos es va instaurar a Catalunya, de la mateixa manera que a la resta de l'Estat i de la Unió Europea (UE), el pla de vigilància activa de les encefalopaties espongiformes transmissibles (EET) animals en remugants. El grup en el qual acabava d'entrar, des del 1996 estava analitzant mostra aleatòria de remugants i els casos que presentaven simptomatologia nerviosa.

Per donar sortida a la nova demanda d'anàlisi generada per l'entrada en vigor dels nous reglaments (3) es van crear a Catalunya tres laboratoris dependents del Departament de Salut Pública, llavors anomenat

INTRODUCCIÓ

Departament de Sanitat i Seguretat Social (a Manresa, Girona i la Seu d'Urgell) per a l'anàlisi de les canals sacrificades per a consum humà i un laboratori dependent del Departament d'Agricultura, Ramaderia i Pesca (a la Zona Franca, Barcelona) per a l'anàlisi d'animals morts en explotació i animals de risc (provinents d'eradicació de focus d'EEB, cohorts...). A més a més, es va crear, de forma conjunta per part de tots dos departaments el laboratori PRIOCAT, ubicat a la Facultat de Veterinària, que, sota els auspicis del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), començaria a funcionar, en el temps rècord de dues setmanes, com a laboratori de referència per confirmar els casos diagnosticats als altres quatre laboratoris i com a laboratori de suport al pla de vigilància.

A finals del 2002 la recent doctorada responsable del PRIOCAT (la Dra. Sisó) deixava el lloc de treball per aventurar-se en la recerca en prions en l'àmbit europeu. Aquella va ser, si se'm permet, una decisió molt oportuna, ja que va fer possible que jo entrés a formar part del PRIOCAT just en el moment en què la beca del projecte europeu pràcticament s'havia esgotat. El PRIOCAT ha estat la plataforma que ha permès desenvolupar el treball de recerca que conforma la tesi que teniu a les vostres mans.

1.3. El diagnòstic: proves ràpides i tècniques neuropatològiques

Un total de 50 casos d'EEB i dos de TO han estat diagnosticats i confirmats fins a finals del 2005 al PRIOCAT. Gràcies a la bona entesa amb el Departament de Salut Pública i a la inestimable col·laboració del personal que treballa als escorxadors autoritzats per al sacrifici de bovins majors de 24 mesos, el laboratori ha pogut obtenir una considerable col·lecció d'encèfals.

Actualment, aquesta col·lecció és gestionada pel Banc de Teixits Animals de Catalunya (BTAC), una entitat pionera en el seu camp que, en part, deu la seva existència a les mostres proporcionades pel laboratori PRIOCAT. El fet, doncs, de disposar d'unes instal·lacions adequades per al treball amb aquest tipus d'agent i l'oportunitat d'obtenir mostres d'alt interès científic a les quals poca gent té accés han estat els pilars de la tesi.

El diagnòstic *post mortem* de les EET es basava fins fa pocs anys en la identificació de la famosa tríada de lesions al sistema nerviós central (SNC) associades a aquestes malalties: canvi espongiforme, astrogliosi i pèrdua neuronal (4). Més endavant s'hi va afegir la detecció, mitjançant tècniques immunohistoquímiques (5), de la proteïna prió resistent (PrPres): l'únic marcador molecular conegut fins al moment de les malalties priòniques (6). La instauració de la vigilància activa a gran escala a tota la UE va forçar la sortida al mercat de les anomenades *proves ràpides*. Les tres que van sortir al principi i bona part de les que s'han anat desenvolupant des de llavors es fonamenten en una immunodetecció de la PrPres basant-se en la seva propietat de ser parcialment resistent a la digestió per proteases, per diferenciar-la de la proteïna prió cel·lular (PrPc) (7-9). Recentment han sortit aproximacions que, sense que puguin prescindir de

INTRODUCCIÓ

la immunodetecció, utilitzen altres propietats de la PrPres per diferenciar-la de la PrPc, com ara que la seva conformació amaga certs epítops (immunoassaig dependent de conformació, CDInpro) o en la seva afinitat per certs lligands químics (Seprion ligand, Idexx Herdcheck). L'ús de la immunohistoquímica persisteix avui dia com una de les proves confirmatòries davant d'un resultat positiu o dubtós obtingut en alguna de les proves ràpides abans mencionades. També cal subratllar l'aparició d'anticossos que reconeixen específicament la forma resistent del PrPres (10) tot i que, fins al moment, no s'ha traduït en l'aparició de cap prova de diagnòstic.

L'estudi dels encèfals de casos positius mitjançant dues d'aquestes proves ràpides (Prionics Check Western Blott -WB- i Prionics-Check Luminiscence Immunoassay -LIA-, ambdues validades per al diagnòstic de l'EEB en tronc encefàlic) en col·laboració amb els propis fabricants dels kits comercials va concloure amb la realització del primer dels estudis que conformen la tesi. Totes dues tècniques detecten la presència de la PrPres en homogenats de teixit nerviós. L'avaluació de la distribució d'aquesta proteïna en les diferents regions de l'encèfal ens va permetre caracteritzar els casos ordenant-los seguint una hipotètica progressió de la malaltia (de més afectats a menys afectats).

Amb l'ajuda d'una de les dues proves ràpides, la transferència Western (*Western Blotting*), i afegint-hi algunes modificacions, vam enfocar un segon treball destinat a obtenir l'anomenat perfil molecular. Aquest perfil consisteix a valorar tres característiques bioquímiques de la PrPres: el pes molecular de la proteïna un cop lliure de glicosilacions, el patró de glicosilació (percentatges relatius de les diferents glicofomes) i l'afinitat diferencial a dos anticossos dirigits a diferents regions de la proteïna (6H4 i P4). Aquestes tres característiques permeten una discriminació inicial entre els diferents *conformers* (les mal anomenades *soques*) que causen les diferents EET animals.

Aquests dos estudis conjunts ens han permès descartar la presència de casos atípics d'EET en els casos diagnosticats a Catalunya.

Finalment, un cop hem caracteritzat aquests casos de camp hem volgut aprofundir en el seu estudi, d'una banda, analitzant amb detall el comportament del dipòsit de la PrPres (aquest cop mitjançant tècniques d'immunohistoquímica) i de l'altra, investigant, també sobre teixit, certs mecanismes patogènics de la malaltia. Aquests mecanismes inclouen la resposta cel·lular al dipòsit de PrPres tant de les poblacions gials com de les neuronals i l'estudi de proteïnes sinàptiques, dels marcadors de matriu extracel·lular, dels processos de mort neuronal i dels fenòmens d'estrès oxidatiu.

Aquesta metodologia d'estudi l'hem aplicada finalment a casos de camp de TO. A causa de la baixa incidència d'aquesta malaltia a Catalunya, les mostres d'aquests casos han estat obtingudes del Centre Nacional de Referència de les EET (el CNREET) de la Universitat de Saragossa.

INTRODUCCIÓ

L'aprenentatge, aplicació i interpretació de tècniques neuropatològiques per a l'estudi de la patologia nerviosa animal han estat les activitats principals en les quals he rebut formació i en què es fonamenta aquesta tesi doctoral.

2. Les malalties priòniques:

2.1. L'agent etiològic: el prió

La hipòtesi que fins a data d'avui ha rebut més suport de la comunitat científica sobre quina és la causa de les malalties priòniques és la coneguda com la *protein only hypothesis*, o hipòtesi de tan sols proteïna, postulada per S.B. Prusiner l'any 1982. Segons aquesta teoria l'agent causal consistiria únicament en una proteïna, la PrPres, capaç de transmetre la malaltia (11).

En un començament, es va demostrar que aquest tipus de malalties es podien transmetre experimentalment entre animals mitjançant inoculació d'homogenats de teixit nerviós d'espècimens afectats a espècimens sans (12). L'estudi del kuru, encefalopatia transmissible detectada en una tribu aborigen a Papua Nova Guinea (13) i la seva correlació amb la TO (12, 14), va permetre arribar a aquesta conclusió: es tractava d'una encefalopatia transmissible. Més endavant s'aniria relacionant amb altres encefalopaties humanes com ara la malaltia de Creutzfeldt-Jakob (MCJ), insomni familiar fatal (IFF), síndrome de Gerstmann Straussler Scheinker (GSS) i encefalopaties animals com l'encefalopatia transmissible del visó (ETV), la malaltia caquectitzant crònica (MCC) o *Chronic Wasting Disease* i finalment amb l'EEB i les seves variants l'encefalopatia espongiforme felina (FSE) i la variant de la MCJ (vMCJ).

Hi mancava, però, determinar quin tipus d'agent era el que contenien aquells homogenats de cervell. Inicialment es parlava de virus lents degut al llarg període d'incubació que presentaven aquest tipus de malalties (15, 16). Diversos experiments van portar a la purificació d'una partícula proteica que era necessària per a la infectivitat (17). L'anomenaven prió o *prion* com a acrònim de *proteinaceous infectious particle*. Es demostrava també que la presència d'àcids nucleics no era una condició necessària per a la transmissibilitat (11), ja que els seus processos d'inactivació, com ara raigs UV, radiacions ionitzants, nucleases, etc., no aconseguien eliminar-ne la infectivitat.

La recerca d'àcids nucleics associats a la infectivitat es va encaminar cap a l'estudi d'aquesta proteïna. La seva seqüenciació i la posterior obtenció del cDNA va portar a descobrir que l'mRNA que codificava per a la proteïna en qüestió es trobava tant en animals sans com en animals infectats (18). Encara més, els nivells d'mRNA no variaven durant la progressió de la infecció. Es va descartar també que les mateixes

INTRODUCCIÓ

partícules infeccioses portessin associat cap tipus de material nucleic que les codifiqués (19).

La digestió, amb proteïnasa K, d'extractes cerebrals d'animals infectats amb TO donava lloc a partícules de PrPres entre 27 i 30kD, mentre que eliminava tota presència de PrPres o PrPc en animals sans (17). D'altra banda, la seqüència aminoacídica d'ambdues proteïnes va resultar idèntica (20). L'única diferència, la que conferia a una la propietat de ser patològica, consistia en l'estructura final, en la seva conformació (6, 21).

Aquest és, doncs, un dels punts més importants i, alhora, interessants que cal tenir en compte per entendre la patogènia de les malalties prioniques: l'agent infecciós, la proteïna prionica, és codificat pel propi hoste (20), però serà una forma alterada o anòmala d'aquesta proteïna pròpia que s'associarà a l'aparició de la malaltia.

Per a molts la prova definitiva de la certesa de la hipòtesi de *tan sols proteïna* han estat els experiments duts a terme pel grup de S.B. Prusiner en què s'ha demostrat la infectivitat partint de proteïna recombinant (22).

Així doncs, el substrat per emmalaltir d'una malaltia prionica és dins mateix de cada hoste. Però la seqüència de fets pels quals la proteïna esdevé anòmala en cada variant de la malaltia és variable. Pot arribar des de l'exterior. Aquest seria el cas de les formes transmissibles (com el kuru, la TO, l'EEB i la vMCJ) on, per mecanismes que després explicarem, la proteïna prionica exògena és capaç d'entrar a l'organisme, trobar la proteïna prío cel·lular, transformar-la i causar la malaltia. Però el perill també pot venir de l'interior de cada organisme, ja sigui per mutacions esporàdiques (MCJ) o hereditàries (IFF, GSS) que resulten en una proteïna prío cel·lular amb una seqüència aminoacídica que la fa més susceptible a transformar-se en la forma patològica.

Tanmateix, tot i que la teoria de tan sols proteïna permet explicar en gran mesura les malalties prioniques, hi ha resultats experimentals en què, en absència de PrPres detectable es demostra infectivitat (23). De fet, hi ha grups que sostenen que, malgrat que no s'hagi identificat, hi ha d'haver un agent infecciós convencional, de tipus víric, al darrere de les malalties prioniques (24-26) o, almenys, algun tipus d'àcid nucleic (27). Amb la finalitat d'explicar alguns dels resultats en què la infectivitat es dissocia de l'acúmul de PrPres es parla d'una tercera forma de PrP, diferent de la cel·lular i de la resistent, que seria la forma infecciosa, però aquesta seria sensible a la digestió amb proteases; d'aquí que no es pugui detectar amb els mètodes usats per detectar la PrPres; l'anomenen PrP* (o PrP-star). Aquesta hipòtesi considera que la PrPres consisteix en un producte final, estable i fibril·lar del procés i es considera no infecciosa (28).

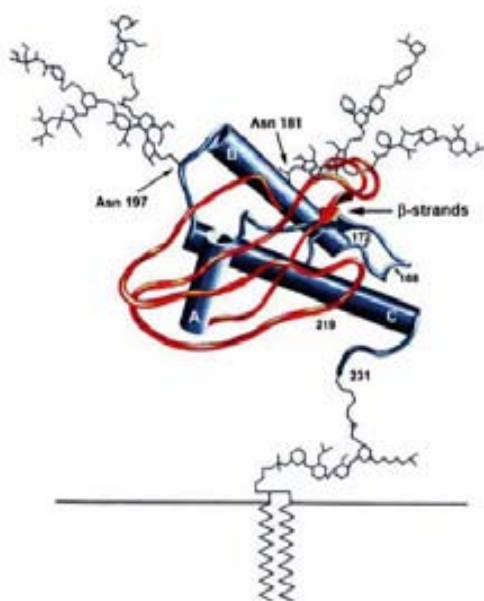
INTRODUCCIÓ

2.1.1. La PrP cel·lular

És, doncs, necessari dedicar uns quants paràgrafs a conèixer una mica en profunditat la PrPc, proteïna que, com hem dit, és codificada pel propi genoma de l'hoste. Veurem que aquesta proteïna és el substrat imprescindible per al desenvolupament de les malalties priòniques i en descriurem les propietats i les funcions putatives.

La PrPc és, encara avui en dia, una gran desconeguda. Estudis en què es fan servir ratolins *knockout* del gen que codifica per a la PrPc, el Prnp (en les espècies ovina, bovina i humana s'anomena PRNP), van donar resultats força sorprenents: aparentment aquests animals eren completament normals (29), tan sols es va poder observar una lleugera alteració del ritme circadiari (30) i de l'activitat locomotriu (31). Així doncs, ens trobem amb una proteïna que sembla que és prescindible per a un desenvolupament normal. Ara bé, aquests animals carents de PrPc van ser totalment resistents a la infecció amb PrPres (32, 33). Aquesta és una de les evidències més febles de la hipòtesi de tan sols proteïna.

La PrPc madura (figura 1) és una sialoglicoproteïna de 209 aminoàcids, pot presentar dos residus glicosilats i presenta una estructura on predomina l'hèlix alfa. Té un domini plegat entre els residus 90 i 231 i una cua flexible N-terminal que incorpora una sèrie d'octarepeticions (34, 35). La PrPc s'ancora a la membrana plasmàtica, encarada a l'espai extracel·lular, mitjançant una àncora glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) C-terminal (36) i s'associa a microdominis de membrana rics en colesterol (37). S'expressa en la majoria de cèl·lules de l'organisme, però de forma predominant al teixit nerviós (38). Se l'associa amb funcions d'exocitosi per la seva interacció amb la sinapsina I, tant en cèl·lules nervioses com en cèl·lules del sistema endocrí (39). També és abundant en les cèl·lules epitelials de l'estómac, associada als grànuls de secreció i a l'epiteli secretor de la glàndula mamària (40).



L'estudi del cicle cel·lular de la PrPc (figura 2) és important per entendre la patogènia de les EET, en concret, per entendre el canvi conformacional.

Figura 1. Model de PrPc fixada a la superfície externa de la membrana plasmàtica neuronal mitjançant una àncora GPI a l'extrem C-terminal (blau). L'extrem N-terminal (vermell) és poc estructurat i conté tan sols dos petits fragments de làmina beta. En el procés de canvi conformacional a PrPres aquesta regió adopta una estructura beta. L'extrem C-terminal està ordenat en les dues formes de la PrP i conté tres cadenes d'hèlix alfa, les dues més llargues (B i C) estan unides per un pont disulfidic que uneix els residus de cisteïna 179 i 214. S'hi poden observar també dos residus d'asparagina (197 i 181) glicosilats. Gràfic extret de De Armond *et al.* 2004 (41).

INTRODUCCIÓ

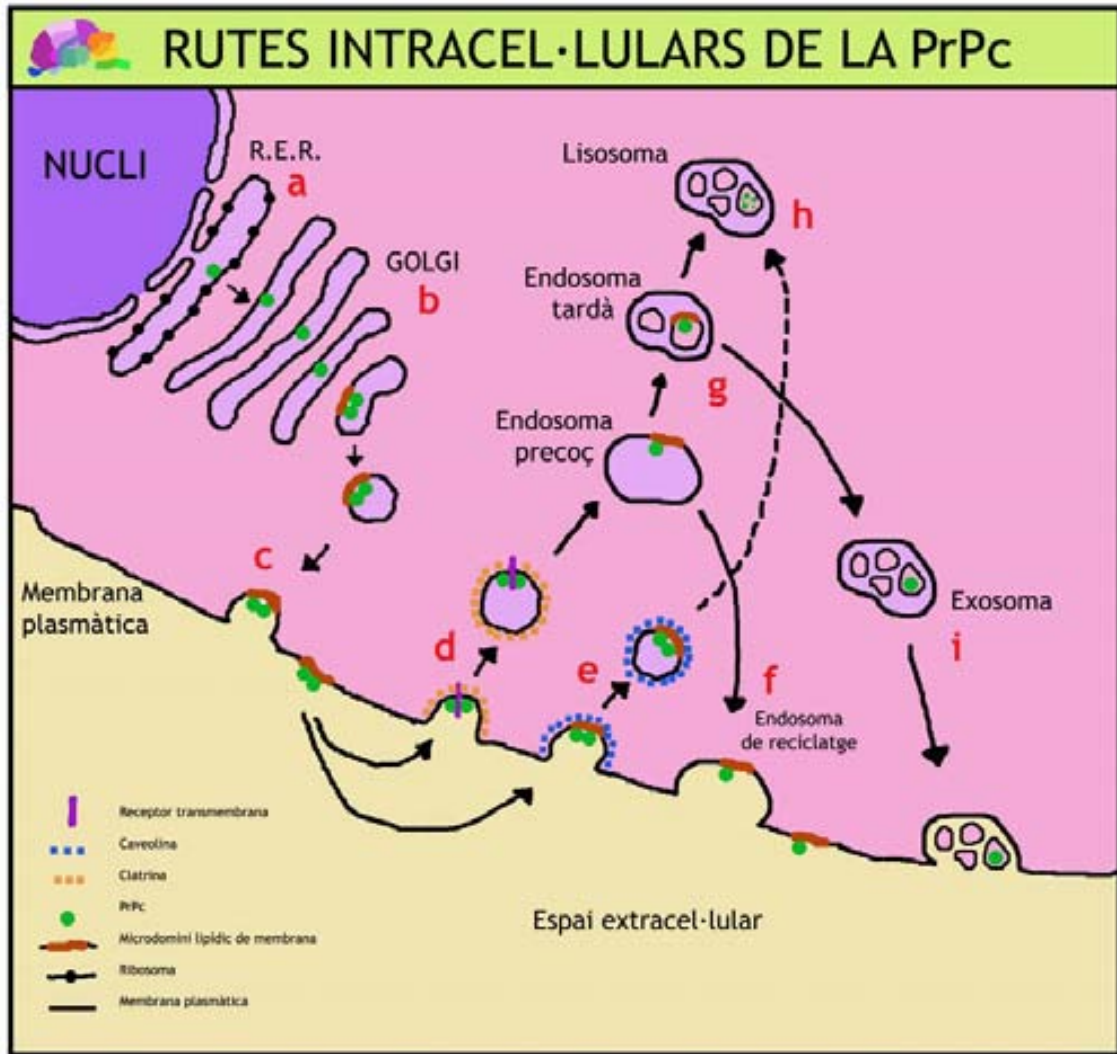


Figura 2. Rutes intracel·lulars de la PrPc

L'mRNA generat a partir del gen *prnp* al nucli de la cèl·lula, és dirigit al reticle endoplasmàtic rugós (RER) on la PrPc serà sintetitzada; en aquest punt sembla que la PrPc adquireix ja les primeres modificacions posttranslacionals (a). La PrPc és transportada a l'aparell de Golgi, on s'associa a microdominis lipídics de membrana rics en colesterol (b). D'allí és translocada a la membrana plasmàtica, encarada a l'exterior, mitjançant una àncora glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (c). Amb la formació de vesícules d'endocitosi entapissades per clatrina, la PrPc és internalitzada. Aquest procés és activat per la unió de coure al fragment N-terminal de la PrPc; això suggereix que la PrPc té funcions de transportador de coure. Un cop a l'interior dels endosomes el pH baix permetria l'alliberament del coure. Aquest procés és independent dels microdominis lipídics i requereix de la presència d'un receptor transmembrana de la PrPc, podria tractar-se de la laminina (d). Una altra possibilitat d'internalització són les vesícules entapissades de caveolina o caveoles (e). El destí de la PrPc un cop forma part dels endosomes precoços pot ser el reciclatge cap a la membrana plasmàtica (f), o bé el pas a endosomes tardans que acabaran formant lisosomes (g) on la PrPc serà degradada en el seu cicle normal de *turnover* (h). En cultius cel·lulars s'han descrit processos d'exocitosi de PrP a l'espai extracel·lular (i) (42, 43).

INTRODUCCIÓ

La PrPc s'ha relacionat amb les membranes presinàptica i post-sinàptica, però també es localitza al citosol. En canvi, sembla exclosa de les vesícules sinàptiques (44-48). S'ha demostrat que durant el desenvolupament del cervell de l'hàmsster, la PrPc es localitza on es dona creixement de neurites. Per tant, és més abundant primerament a la substància blanca, on els axons estan creixent i, més endavant, la trobem en major quantitat a la substància grisa, coincidint amb la sinaptogènesi (49). Això i la interacció de la PrPc amb components de la matriu extracel·lular com els glicosaminoglicans, més concretament els heparan sulfat proteoglicans, (50, 51) o la laminina (52) suggereixen una implicació de la PrPc en el creixement de neurites i l'establiment de sinapsi. Sembla que la PrPc es necessària per a un correcte funcionament de les sinapsis (53).

La PrPc també és una proteïna lligadora d'ions metàl·lics, sobretot de coure i, encara que amb menys afinitat, cations de zenc, manganès i níquel (54). Els llocs d'unió de coure a la PrPc estan descrits a la part N-terminal de la proteïna, porció que presenta una notable flexibilitat estructural. D'això es dedueix que el coure podria tenir una influència important en l'estructura final de la proteïna i, per tant, determinaria la seva unió a altres proteïnes la qual cosa sembla que es produeix, justament, en aquesta regió (46).

Una funció putativa de la PrPc podria ser la de tamponar els nivells de coure lliure, catió altament tòxic, en col·laboració amb altres proteïnes lligadores de coure, com les metal·lotioneïnes o la GSH. S'ha demostrat que el coure estimula l'endocitosi de PrPc quan s'afegeix a cèl·lules de neuroblastoma en cultiu (55). També relacionat amb la seva afinitat al coure s'ha descrit certa activitat antioxidant associada a la PrPc, semblant a la de la superòxid dismutasa 1 (SOD1), dependent de coure i zenc (56).

Finalment, també s'ha associat la PrPc amb la supervivència cel·lular. S'ha demostrat que la PrPc s'uneix a Bcl-2, un factor antiapoptòtic (57), que una sobreexpressió de PrPc activa la via apoptòtica de la caspasa 3 (58) o que la PrPc neuroprotegeix, de forma semblant a Bcl-2, en front a apoptosi induïda per Bax (59). La dimerització de molècules de PrPc mitjançant anticossos anti-PrPc provoca l'apoptosi neuronal. D'això es dedueix que la PrPc pot funcionar com un transductor de senyal (60). Aquestes i altres evidències demostren, si més no, que la PrPc té un rol important en la supervivència cel·lular, ja que alteracions de la seva situació basal (concentració) o, fins i tot, de la seva compartimentació (localització a la membrana plasmàtica, el citosol o el reticle endoplasmàtic) dins la cèl·lula poden desencadenar efectes citotòxics.

INTRODUCCIÓ

2.1.2. Mecanisme de replicació: canvi conformacional

Definirem com a canvi conformacional o transconformació el procés post transcripcional pel qual la PrPc esdevé PrPres.

El canvi conformacional o transconformació de la PrPc, també definit com a malplegament, es pot donar de forma espontània, a resultes de tractaments amb agents desnaturalitzants (61), pressió (62) o mitjançant la introducció de mutacions puntuals en el gen que codifica per a la PrPc. Aquest últim punt permet explicar l'aparició de les variants esporàdiques i hereditàries de les EET humanes, com la MCJ, la IFF o la GSS. Tot i així, per poder justificar la transmissibilitat de les malalties prioniques cal contemplar també l'existència del canvi conformacional de la PrPc induït, aparentment, per la mateixa PrPres. Segons la hipòtesi de tant sols proteïna la PrPres és l'agent infecciós que es propaga a si mateix i provoca la conversió de la PrPc cap a PrPres.

Sembla que aquesta conversió requereix la interacció de la PrPc amb la PrPres quan aquesta es troba en estat d'agregació (*versus* monòmers). La transformació es dona una vegada la proteïna és ancorada a membrana plasmàtica o en vesícules d'endocitosi. La interacció entre PrPc i PrPres que permetrà el canvi conformacional depèn, en gran mesura, de la seqüència aminoacídica, concretament de la del terç central de la proteïna. Canvis en aquesta seqüència poden reduir o, fins i tot, abolir la capacitat de conversió. En això es fonamenta el que es coneix com a *barrera d'espècie*, que es podria definir com la susceptibilitat de les diferents espècies a cada EET (63).

A partir de models de conversió de PrP lliures de cèl·lules i també mitjançant l'estudi dels prions de llevat es discuteixen tres models per intentar explicar el canvi conformacional:

- Conversió induïda per monòmers (*monomer-directed conversion*): model molt simplista pel qual una molècula de PrPc interactuaria amb una de PrPres, que li conferiria la seva conformació. Com a conseqüència del canvi les molècules de PrPres polimeritzarien formant fibril·les d'amiloide (entenem per amiloide aquelles estructures fibril·lars altament ordenades, riques en agregats de làmina beta i que s'autopropaguen) (21, 64).
- Polimerització a partir d'un nucli (*nucleated polymerisation o seeded nucleation*): postula que hi ha un equilibri entre la PrPc i la PrPres, però aquesta última és molt inestable i escassa. El pas limitant no seria el canvi conformacional sinó la possibilitat que suficients molècules de PrPres poguessin formar un oligòmer (nucli o germen), de forma que s'estabilitzarien. Les molècules de PrPres que s'anessin generant s'estabilitzarien a partir d'aquí i s'unirien al nucli, tal com passa en una cristal·lització (21, 64).

INTRODUCCIÓ

– Acoblament al motlle (*templated assembly o template-directed refolding*): en aquest cas els agregats de PrPres actuarien com a motlle al qual s'acoblaria la PrPc. En aquest procés es produiria el canvi conformacional. Aquest canvi seria el pas limitant en aquest model (21, 64).

Sense voler aprofundir més en un aspecte de les malalties prioniques que s'allunya massa de la patologia, sembla que un model que incorpori aspectes de la polimerització a partir d'un nucli i de l'acoblament al motlle seria el més acurat. Segons aquest model (*nucleated conformational conversion*) la polimerització es donaria a partir d'oligòmers que representarien, per als profans en biofísica, una espècie d'intermediari entre la PrPc i la PrPres (65).

Hi ha extensos estudis, amb resultats controvertits, sobre la localització subcel·lular del procés de transconformació (figura 3). Alguns aspectes en aquest àmbit, com el fet que la PrP s'associa, a través del GPI, a microdominis de membrana plasmàtica enriquits en esfingolípid, ens permeten relacionar la patogènia de les EET amb la d'altres malalties com la SIDA i la malaltia d'Alzheimer on s'han descrit unions semblants als esfingolípid per part d'una glicoproteïna de l'HIV i de la β -amiloide (42).

S'han definit múltiples factors que poden afectar les interaccions entre les dues isoformes de PrP. Destaquen els glucosaminoglicans presents a la matriu extracel·lular (en concret l'heparan sulfat proteoglicà). També es parla d'interacció amb molècules d'RNA (66, 67) i amb xaperones i lipoxaperones (42).

El canvi conformacional confereix a la PrPres una sèrie de propietats que la diferencien de la PrPc, com ara que passa a ser insoluble, de fet, polimeritza tot formant fibres d'amiloide i també que es torna parcialment resistent a la digestió per proteases (6).

No es podia acabar aquest apartat sense parlar, encara que breument, de les tècniques de transconformació de la PrPc in vitro. La tècnica de PCMA o *Protein Misfolding Cyclic Amplification* consisteix a afegir a un substrat de PrPc, normalment teixit homogeneïtzat d'encèfal sa, l'homogenat problema, on se suposa que hi ha PrPres. Aquesta PrPres transformaria la PrPc present en l'homogeneïtzat cap a PrPres i d'aquesta manera s'incrementaria la seva concentració final i augmentarien les possibilitats de detectar quantitats petites de PrPres. Per optimitzar aquesta amplificació se sotmeten les mescles a cicles de sonicació per desagregar els polímers de PrPres i afavorir que actuïn com una llavor per crear nous agregats. Sembla que cal anar afegint-hi homogenat d'encèfal fresc per tal que l'amplificació sigui òptima (68). S'ha descrit que la presència de molècules d'RNA és un factor necessari per a l'amplificació (66).

INTRODUCCIÓ

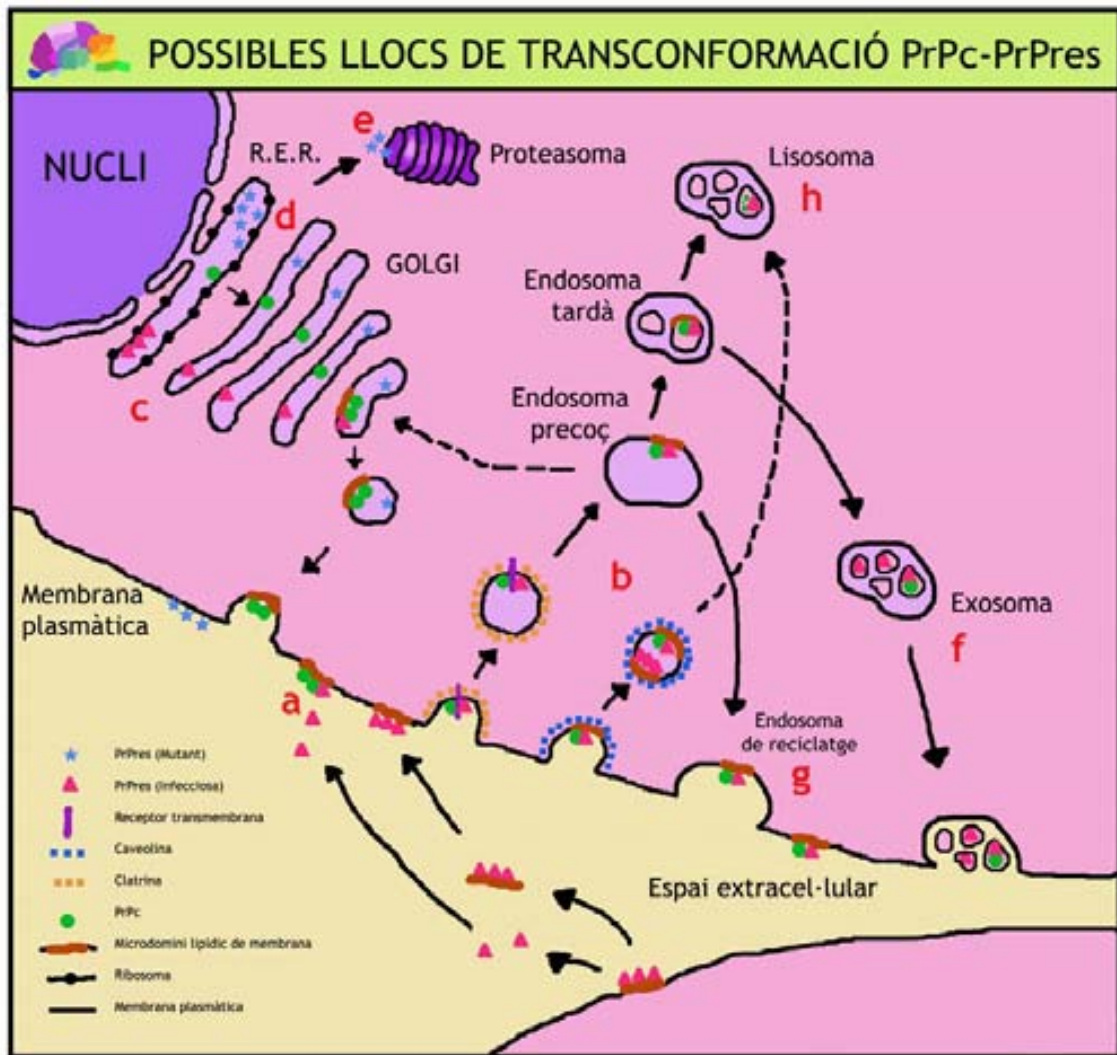


Figura 3. Possibles llocs de transconformació PrPc-PrPres

El primer lloc on potencialment la PrPres entra en contacte amb la PrPc és la membrana plasmàtica (a). Es creu que els microdominis de lípids podrien afavorir la interacció de totes dues formes i seria un dels llocs on es podria donar el canvi conformational (42). La internalització de la PrPres al compartiment endolisosomal (b) sembla que és un pas crucial perquè es doni el canvi conformational, les vesícules actuarien com a bioreactors per a la producció de PrPres. De fet, la inhibició de l'endocitosis atura la formació de PrPres in vitro en models de cultiu cel·lular. Un altre compartiment que podria estar implicat en la transconformació és el RER (c): la PrPres seria transportada retrògradament cap allí on s'amplificaria la producció de PrPres. En el cas de les EET hereditàries el *malplegament* de la PrPres (ja sigui degut a mutacions o esporàdic) es dona al RER (d) Com en el cas d'altres proteïnes malplegades part d'aquesta PrP serà dirigida al proteasoma per a la seva destrucció (e). Però una altra part pot seguir la ruta de l'aparell de Golgi i acabar a la membrana plasmàtica. S'ha demostrat, també en cultius cel·lulars, que la PrPres que s'excreta a través d'exosomes (f) és infecciosa i podria suposar un dels seus mecanismes de propagació intercel·lular. El reciclatge de PrPc cap a la membrana plasmàtica per endosomes (g) sembla que no és determinant per a la formació de PrPres, ja que si s'inhibeix aquest pas no se n'altera la producció. La PrPres que arriba als lisosomes (h), al contrari que la PrPc, no es pot degradar i s'acumula (42, 43).

INTRODUCCIÓ

2.1.3. Diversitat de *soques* de prions i herència conformacional

El fet que aquestes malalties siguin transmissibles implica que les proteïnes han pogut propagar la seva conformació. L'absència d'un component genètic (no s'ha pogut associar cap àcid nucleic amb l'agent infeccios) fa que es comenci a parlar d'herència conformacional (21). La propietat de propagar la conformació en una proteïna no és exclusiva de la proteïna priònica ja que una situació semblant es dona en els dipòsits d'amiloide que s'observen en encèfals de pacients amb malaltia d'Alzheimer (21).

S'han descrit conformacions de la PrPres específiques de cada *soca* o variant de l'EET, conformacions que són propagables fins i tot en sistemes de conversió *in vitro* de la PrPc lliures de cèl·lules (63). Així doncs, aquests *conformers*, químicament idèntics, poden donar lloc a diferents fenotips de la malaltia en un mateix hoste; dos *conformers* d'una proteïna en comparteixen la seqüència lineal d'aminoàcids però presenten una conformació (estructura) diferent (21).

Les *soques* es caracteritzen per donar lloc a diferents fenotips de malaltia, en concret, a diferents perfils de distribució de les lesions. D'aquí han sorgit les tècniques de tipatge de *soques*. Aquestes avaluen el període d'incubació de la malaltia quan s'inocula en determinades línies de ratolins i sobretot en la distribució de les lesions en l'encèfal d'aquests ratolins (69, 70).

També s'ha vist que, tant en models experimentals en rosegadors (71) com en ovelles infectades de TO (72) la *soca* pot determinar el perfil de distribució dels dipòsits de PrPres evidenciats per tècniques d'immunohistoquímica (73).

Una altra manera de caracteritzar les *soques* és mitjançant l'anomenat perfil molecular (74), consistent a estudiar la proteïna mitjançant tècniques de transferència Western per determinar:

- El perfil de glicosilació: aplicant la digestió amb proteïnasa K s'avaluen les proporcions relatives de les fraccions (bandes) que s'obtenen, que corresponen a les diferents glicofomes (formes diglicosilada, monoglicosilada i no glicosilada).
- El pes molecular: segons la conformació de cada *conformer* les dianes de digestió per a la pK estaran exposades de forma diversa i donen lloc a fragments de mida diferent. Si en aquest punt ens desfem dels residus glicosídics mitjançant l'enzim PGNasa ens serà possible avaluar el pes molecular de la PrPres digerida.
- Afinitat per diferents anticossos: degut a la diferent conformació la digestió amb proteïnasa k destruirà, o no, certs epítops de la proteïna que, en conseqüència, presentarà una unió diferencial a certs anticossos dirigits contra aquests epítops.

INTRODUCCIÓ

També s'han descrit altres mètodes per tipificar o caracteritzar molecularment la PrPres, com ara l'anàlisi dels pèptids resultants de la digestió de la proteïna amb l'endopeptidasa Lys-C mitjançant espectrometria de massa (75).

Així, per exemple, en l'estudi de la PrPres en casos de MCJ i de kuru s'han descrit dos tipus diferents de PrPres: tipus 1 i 2. En el tipus 1 la forma no glicosilada pesa 21 kD i en el 2 pesa 19 kD (75). Hi ha estudis anteriors que descriuen fins a 4 tipus diferents de PrPres (76). Recentment s'ha descrit que, segons l'àrea encefàlica estudiada poden coexistir diferents tipus de PrPres en un mateix encèfal (head 2005).

2.2. Introducció a les EET humanes

Totes les EET tenen en comú l'acumulació de PrPres al sistema nerviós central però difereixen en la seva presentació, quadre clínic, lesional transmissibilitat, perfil molecular, genètica, etc. (77). Vegeu la taula 1.

D'especial interès és l'anomenada vMCJ l'origen de la qual es creu que rau en un salt de la barrera d'espècie des de l'espècie bovina, afectada per EEB, a la humana (1, 76). Tot i que l'origen de la EEB es creu que es troba en la TO, hi ha publicacions recents que hipotetitzen sobre un possible origen en l'espècie humana (78).

INTRODUCCIÓ

Taula 1: EET humanes					
Nom	Clínica	Edat	Patologia	Perfil molecular	Genètica
Malaltia de Creutzfeldt-Jakob (MCJ) (79, 80)	Curs subagut. Demència progressiva i signes neurològics (atàxia cerebel·lar, miòclon, signes extrapiramidals, problemes de visió...)	60-70 anys (esporàdica) i 50-60 (familiar). En iatrogènica, període incubació d'1 a 30 anys.	Canvis espongiformes, astrogliosi i pèrdua neuronal. Patrons de dipòsit de PrPres variats.	Es descriuen els dos tipus de PrPres, en tots predomina la forma monoglicosilada sobre les altres dues. Els dos tipus poden, fins i tot, ser concomitants (81).	La forma familiar és heretable de forma autosòmica dominant i cosegrega amb mutacions al gen PRNP. Predisposició si homozigosi per metionina al codó 129. En la forma familiar s'han descrit més de 25 mutacions; cap en l'esporàdica.
Síndrome de Gerstmann Straüssler Scheinker (GSS) (82)	Curs crònic. Disfunció cerebel·lar progressiva (atàxia, disàrtria...), demència i paraparèsia espàstica.	50-60 anys	Presència de plaques d'amiloide de PrPres multicèntriques. Canvis espongiformes, astrogliosi i pèrdua neuronal.	La PrPres, un cop digerida amb pK, presenta quatre bandes a 33/27-29/18-20/7-8 kD (83).	Herència autosòmica dominant. Mutació P102L-129M (prolina per leucina al codó 102 + metionina al codó 129) i fins a 7 d'altres de molt poc freqüents.
Insomni familiar fatal (IFF) (84)	Insomni i disfunció autonòmica.	50 anys (20-63)	Afecció del tàlem, que s'atrofia, i afecta sobretot els nuclis mediodorsal, anteroventral i el nucli olivar inferior.	Tres bandes 28/26/19 kD (tipus 2); predomina la diglicosilada sobre les altres dues (85).	Herència autosòmica dominant. Mutació D178N-129M (asparagina per ac. aspàrtic al codó 178, metionina al 129).
<i>Kuru</i> (13)	Atàxia cerebel·losa i tremolors. Transmissió per ritus de canibalisme.	Període d'incubació entre 4,5 i 40 anys	Degeneració i pèrdua neuronal, astrogliosi i microgliosi, canvis espongiformes, pèrdua de mielina i manegots perivasculars mononuclears. Presència de plaques d'amiloide.	PrPres tipus 2 (86).	Metionina al codó 129 del gen PRNP relacionada amb aparició més precoç del quadre.
Variant de la MCJ (vMCJ) (76)	S'inicia amb un quadre psiquiàtric (depressió, ansietat, conducta antisocial) i disestèsia; més endavant presenten dèficits neurològics i demència.	29 anys (12-74).	Canvis espongiformes, astrogliosi i pèrdua neuronal. Plaques florides (plaques d'amiloide de PrPres envoltades de vacúols).	PrPres de tipus 2, la glicofoma predominant sempre és la biglicosilada sobre les altres. Aquest perfil coincideix amb el de l'EEB i el de l'EEF (1, 86).	El 100% de casos són homozigots per metionina al codó 129.

INTRODUCCIÓ

2.3. Introducció a les EET animals

La incursió de la medicina veterinària en el camp de les EET comença amb la TO, de la mà del neuropatòleg veterinari nord-americà Hadlow el 1959, que la relaciona amb el *kuru* (87). No és fins que s'estableix una relació entre l'EEB i la vMCJ que l'estudi de les EET esdevé un camp realment important dins de l'àmbit de la veterinària.

L'interès de l'estudi d'aquest grup de malalties és, doncs, múltiple. D'una banda, les diferents EET animals ens serviran com a models de les corresponents malalties que afecten els humans. D'altra banda, tenim el propi interès per la medicina veterinària, ja que la malaltia es pot presentar en espècies d'interès productiu (bovins, ovins, caprins, visons, cèrvids...) i domèstic (gats). Cal afegir, però, un tercer factor d'interès: el de la salut pública. El fet que s'hagi demostrat la transmissibilitat de l'EEB a l'ésser humà la converteix en una zoonosi que ha tingut, i continua tenint, importants conseqüències socioeconòmiques a escala global.

2.3.1. Tremolor ovina (TO) en anglès: *scrapie*

També coneguda com a pruija lumbar. Afecta petits rumugants (ovelles i cabres) i és l'EET que fa més temps que es coneix, des del 1732 (88). És endèmica en molts països. Contràriament a l'EEB, no és transmissible a l'ésser humà però sí que s'ha transmès experimentalment a l'espècie bovina. La transmissió de la malaltia és horitzontal a través de ferides o per ingesta de teixits contaminats, com la placenta. També es descriu transmissió maternal que inclou tant transmissió vertical com perinatal (89, 90).

Clínica: els símptomes més freqüents són pruija i alteracions de la llana/pell, atàxia, tremolor del cap, alteració de l'estat mental, dèficits propioceptius, pèrdua de condició corporal, positivitat al reflex de rascat, postura anormal del cap (cap cot) i bruxisme (91, 92).

Edat: variable segons la soca i el genotip, de 2 a 4 anys és el més freqüent. En genotips susceptibles es pot detectar PrPres a l'intestí al cap de dos mesos d'inoculació (93).

Patologia: vacuolització de neurones i espongiós al neuròpil juntament amb altres imatges de neurodegeneració (cromatòlisi, neuronofàgia, picnosi neuronal...). La distribució de les lesions és simètrica i bilateral. També s'acompanya de gliosis (94). Es descriu certa variabilitat individual del patró lesional; aquesta variabilitat s'atribueix a diferents factors com ara el genotip de gen PRNP, la raça i la *soca* que produeix al malaltia. Altres factors determinants del patró lesional són la dosi, la via d'entrada i el moment d'infecció.

INTRODUCCIÓ

Perfil molecular: el pes molecular de la banda no glicosilada és lleugerament superior al de la PrP de l'EEB i es diferencien perquè la proporció de la banda monoglicosilada és superior en la TO. Finalment, la PrP de TO és reconeguda per l'anticòs monoclonal P4, dirigit a un epítop de l'extrem C-terminal de la proteïna. Aquest epítop és pràcticament absent en el cas de la PrP de l'EEB ja que aquesta, degut a la seva conformació, és digerida en major proporció per la pK (74).

Genètica: la susceptibilitat a la TO està determinada en gran mesura pel genotip que presenti cada ovella als codons 136, 154 i 171 del gen *prnp* (95). Es defineixen diferents graus de susceptibilitat segons el genotip, que van des d'animals resistents a la infecció fins a animals altament susceptibles. A partir d'aquest fet es va dissenyar al Regne Unit un pla conegut com a *National Scrapie Plan* (96) per eradicar aquesta malaltia fent selecció genètica a favor dels genotips més resistents; aquesta política s'ha estès a la resta de la UE. En les cabres també s'han descrit polimorfismes associats a la susceptibilitat a la TO.

2.3.2. Encefalopatia espongiforme bovina (EEB)

Mal anomenada, popularment, malaltia de les vaques boges. Descrita per primer cop al Regne Unit el 1986 (97). Afecta el bestiar boví, però s'ha demostrat experimentalment que pot afectar també petits remugants (91). Es considera que és l'origen d'altres EET animals com l'encefalopatia espongiforme felina (98) i d'una EET humana la vMCJ. Recentment s'ha descrit el primer cas natural d'EEB en una cabra (99). La transmissió de la malaltia és per ingesta de materials contaminats amb prions d'origen boví.

Clínica: de curs insidiós, presenta simptomatologia caracteritzada per pèrdua de pes, disminució de la producció lletera, canvis comportamentals i signes sensitius i motors. Els canvis de comportament més freqüents són l'aprehensió i temperament anormal. Els canvis sensitius més típics són hipersensibilitat davant d'estímuls tàctils, auditius i visuals, coces durant la munyida i llepades als llavis i narius en excés. Pel que fa a canvis motors s'observa atàxia, caiguda i incapacitat de posar-se dempeus (100).

Edat: el període d'incubació mitjà és d'uns 5 anys. S'ha detectat, de forma subclínica, en animals de 16 mesos.

Patologia: focalitzada al sistema nerviós central, consisteix en canvis espongiformes, vacuolització de cossos neuronals i gliosi reactiva, especialment astrogliosi. Es descriuen també canvis degeneratius i pèrdua neuronal (4).

Perfil molecular: és idèntic al de la vMCJ, PrPres de tipus II, amb predomini de la glicofoma diglicosilada (76).

INTRODUCCIÓ

Genètica: fins fa poc temps no s'havia associat cap polimorfisme del gen PRNP amb la susceptibilitat a EEB en bovins; recentment, un grup alemany sembla que n'ha trobat un en races bovines alemanyes (101).

2.3.3. Altres

Malaltia caquetitzant crònica (MCC): en anglès, *chronic wasting disease* (CWD), és una EET que afecta cèrvids tant captius com silvestres als Estats Units d'Amèrica i el Canadà (102), concretament a cérvol-mula (*Odocoileus hemionus*), cérvol de cua blanca (*Odocoileus virginianus*) i ant (*Cervus elaphus nelsoni*). La seva patogènia no està relacionada amb l'EEB ni amb la TO.

Encefalopatia transmissible del visó (ETV): en anglès, *transmissible mink encephalopathy* (TME), afecta granges de visons (103). Tampoc no s'ha relacionat ni amb l'EEB ni amb la TO.

Encefalopatia espongiforme felina (EEF): descrita en gats domèstic i en felins captius en zoològics (puma, guepard, ocelot, lleó...). Se la relaciona amb la ingesta de teixits de vacú amb EEB (98, 104, 105). El patró lesional coincideix amb l'EEB i també el perfil molecular de la PrP que s'acumula al SNC (76).

Finalment, s'han descrit altres encefalopaties transmissibles, també relacionades amb ingesta d'aliments contaminats amb EEB, en remugants de zoològic (ant, nyala, òrix, cudú gran) (106-109) i primats (*Macaca mulatta*) (110).

2.3.4. L'aparició dels casos atípics

L'establiment de programes de vigilància actius obligatoris a tota la Unió Europea (UE), tant de l'EEB (2001) com de la TO (2002) no tan sols ha fet augmentar substancialment el nombre de casos diagnosticats d'ambdues malalties sinó que ha desembocat en l'aparició dels anomenats casos atípics.

Pel que fa a la TO, el primer cop que es parla de casos atípics és a Noruega en casos diagnosticats l'any 1998, raó per la qual són batejats com a casos Nor98. Es diferencien per presentar un perfil molecular diferent: l'anàlisi per transferència Western de la PrP revela una major sensibilitat a la pK i se n'obtenen 5 bandes, una de les quals està a l'altura dels 12kD. La distribució dels dipòsits de PrP també és diferent que la de la TO clàssica, essent més abundant a les escorces cerebel·losa i cerebral que no pas al tronc. De fet, es descriuen casos on la presència de PrP al tronc de l'encèfal és nul·la (111). Aquest fet té rellevància quant al diagnòstic ja que la regió diana per al diagnòstic de la TO és, justament, el tronc de l'encèfal. Sembla que la seva presentació és de caràcter esporàdic i no transmissible tot i que s'ha

INTRODUCCIÓ

aconseguit transmetre la malaltia inoculant ratolins transgènics que sobreexpressen la PrP ovina (112).

Altres casos atípics, descrits a Alemanya pel grup del Dr. Groschup (113), han sortit a la llum perquè presenten resultats discordants entre els diferents test ràpids que s'empren per al diagnòstic. Aquest mateix grup ha publicat també casos atípics, de fenotip semblant als Nor98 però amb la particularitat que afecten animals amb genotips considerats, fins al moment, resistents a la TO (114). Aquest fet fa que calgui qüestionar-se, si més no, la validesa dels programes de selecció que s'estan duent a terme per eradicar aquesta malaltia.

Altres països han descrit també casos atípics de la TO: França (112), Portugal (115), Alemanya (116), Suècia (117) i Espanya (comunicació personal: Dr. R. Juste, Neiker i Dr. J.J.Badiola, CNREET).

Quant a l'EEB, un grup italià (118) va descriure també un cas atípic que definia com a variant amiloidòtica de l'EEB ja que el patró lesional consistia en dipòsits de PrPres en forma de plaques d'amiloide. Aquest és un tret característic de la TO, per exemple, però que no s'observa en els casos típics d'EEB (118). La distribució regional de la PrPres també es focalitza en aquest cas en regions de l'encèfal diferents del tronc encefàlic (bulbs olfactoris, escorça frontal, hipocamp i tàlem). A aquesta descripció cal sumar-hi les d'altres grups de Suècia (117), Irlanda (119), Japó (120) i França (121). L'atípia, en aquests últims casos, es defineix com a diferències en el perfil molecular. Es tracta de PrPres amb característiques semblants a les de la TO: major pes molecular de la banda no glicosilada i major afinitat per l'anticòs P4 (amb diana més propera a l'extrem N-terminal de la proteïna).

L'estudi de la variabilitat de l'agent causal de les EET animals permetrà entendre també les diferents variant humanes.

2.4. La patogènia

patogènia *f*

Part de la patologia que estudia el mecanisme pel qual les causes morboses actuen damunt l'organisme per a produir la malaltia.

Diccionari enciclopèdic de medicina © Enciclopèdia Catalana, S.A. 1997- 2006

Aquesta secció tractarà, doncs, dels mecanismes que es donen des de l'entrada de l'agent infeccios a l'hoste i que desemboquen en un procés de neurodegeneració. Se centrarà en la patogènia de l'EEB i la TO en vaca i ovella, respectivament, encara que molts dels passos s'han pogut explicar gràcies a l'estudi de les EET que afecten l'espècie humana i gràcies a models experimentals, desenvolupats sobretot en ratolí, hámster i també amb models en ratolins transgènics.

INTRODUCCIÓ

2.4.1. El procés de neuroinvasió

En el context de les EET animals, i deixant de banda les hereditàries, l'entrada del prió més habitual serà la perifèrica. En el cas de l'EEB, l'entrada és a través de la ingesta de pinsos contaminats amb prions (4). En el cas de la TO, a més a més, trobem la ingesta de la placenta i també a través de petites ferides a la pell ja sigui provenint d'altres animals infectats o de la contaminació present al medi (93, 122).

En el cas dels petits remugants, la ruta de neuroinvasió varia substancialment depenent tant de l'agent infecció implicat (soca o *conformer*) com de l'espècie de l'hoste i de la seva susceptibilitat genètica (93, 123-125).

En el cas d'una ingesta de l'agent es defineixen diferents punts d'entrada que impliquen sempre el sistema immunitari (126). El primer punt d'entrada seria la tonsil·la palatina; en aquest punt el teixit limfoide està barrejat amb l'epiteli escamós del paladar amb l'objectiu d'identificar antígens que entrin per aquesta via. El segon punt d'entrada és a l'intestí prim, sobretot a l'íleon, que és on es concentren les plaques de Peyer o teixit limfoide associat a l'intestí (GALT): aquest és un dels punts d'entrada més importants. Allí les cèl·lules M (enteròcits modificats per la presència de limfòcits B subjacents) capten proteïnes sense degradar-les com a sistema per identificar antígens. Aquest procés permet el pas de la PrPres cap al teixit limfoide, allí s'acumularà i es replicarà en cèl·lules macrofàgiques i en cèl·lules fol·liculars dendrítiques (CFD) (126). Aquest tipus cel·lular és crucial en la patogènia de les EET. Estudis en ratolins transgènics van demostrar que en absència de limfòcits B els ratolins eren resistents a la infecció per PrPres. Més tard es va demostrar que l'absència de limfòcits B impedia que maduressin les CFD i així s'impedia que aquestes acumulessin el prió (127). Sembla que els fol·licles limfoides, estructures a les quals s'associen les CFD, són un bon substrat per a la replicació de la PrPres. De fet, la presència d'aquestes estructures en localitzacions anormals, com ara en casos d'inflamació crònica, s'ha demostrat que permeten la acumulació de PrPres. Això fa que, per exemple, mamitis cròniques amb la consegüent formació de fol·licles limfoides el teixit mamari puguin esdevenir una via d'excreció de prions per la llet o en el cas de nefritis cròniques, per orina (128, 129).

Un cop la PrPres s'ha establert al teixit limfoide intestinal s'estén proximalment i distalment al llarg del tracte gastrointestinal per aquest teixit; posteriorment passa a acumular-se al sistema nerviós entèric (124). El primer punt del sistema nerviós on es detecta PrPres és als ganglis dels plexes que trobem a l'íleon i, a continuació, s'estendrà de forma similar a com ho ha fet prèviament pel teixit limfoide (124). D'aquí, mitjançant estructures nervioses del sistema nerviós autònom, del parasimpàtic concretament, la PrPres seria capaç

INTRODUCCIÓ

d'arribar a sistema nerviós central per dos punts: 1) la medul·la espinal a l'alçada del tòrax (columna intermediolateral, segments T5-L1) a través del nervi esplàncnic i els ganglis mesentèric cranial i celíac, i 2) a la medul·la oblonga al nucli motor dorsal del nervi vague. Estudis de distribució tissular de la PrPres mitjançant IHQ han permès arribar a aquestes conclusions en hàmmster (124, 130) i en ovella (93, 123).

De totes maneres, el procés de neuroinvasió no es pot simplificar tant ja que no es pot descartar que una fracció de PrPres circuli per la sang. Recentment s'han publicat experiments en què es dona transmissió de la TO amb transfusions sanguínies (131). Factors com el genotip de l'hoste també faran variar la ruta de neuroinvasió. Així, en ovis amb els genotips més resistents al codó 129 del gen PRNP (ARR, ARQ ...) sembla que la implicació del teixit limfoide és mínima ja que s'ha vist que es pot donar neuroinvasió sense que aquest acumuli PrPres (132). En EEB la replicació del prió també es restringeix al SNC (133).

Finalment, s'han suggerit altres possibles vies d'entrada de la PrPres com la mucosa olfàctòria en humans (134) o a través de ferides a la llengua en un model d'ETV en hàmmsters (135).

L'aproximació que s'ha utilitzat de forma més generalitzada per avaluar el procés de neuroinvasió consisteix en l'estudi de la presència de PrPres en els diferents òrgans i cèl·lules mitjançant tècniques immunoquímiques (transferència Western, ELISA) o immunohistoquímiques.

2.4.2. El dipòsit de PrP

En totes les EET el dipòsit de PrPres al SNC és considerat com un dels marcadors indiscutibles de la malaltia (6). Tot i que sempre hi ha qui ho posa en dubte, la hipòtesi de *tan sols proteïna* postula que la mateixa PrPres que s'acumula és l'agent etiològic. Recentment, però, es comença a discutir si podria tractar-se d'una mera conseqüència de la malaltia en lloc de la seva causa (28).

Com s'ha comentat abans, una de les característiques de la PrPres que s'acumula és la seva resistència a la digestió amb proteases. Doncs be, un cert nombre d'estudis ha començat a dissociar la infectivitat dels teixits de la presència o acúmul de PrPres: en alguns models s'ha descrit la presència d'infectivitat sense que es pogués demostrar acúmul de PrPres al SNC (23, 136).

De totes maneres el dipòsit de PrPres segueix sent una de les característiques comunes que defineix totes les EET. El que sí que és clar és la seva correlació amb l'aparició de lesions i la proliferació de cèl·lules gials, i s'ha convertit en la diana de tots els kits de diagnòstic desenvolupats fins al moment. De fet, a mesura que es desenvolupen les tècniques de detecció de PrPres s'ha anat descobrint que no només

INTRODUCCIÓ

la podem trobar associada al teixit linfoide i al nerviós sinó també a d'altres teixits com el teixit muscular (137-139) i fins i tot en sang (68).

Inicialment l'estudi de la presència o acúmulo de PrPres es basava en la detecció de les anomenades fibril·les associades a *scrapie* (SAF) mitjançant microscòpia electrònica (140) i, més endavant, mitjançant transferència Western. Els ratolins Prnp^{0/0} han estat de gran utilitat per a l'elaboració d'anticossos per a la immunodetecció de PrPres. La majoria d'anticossos que hi ha al mercat estan elaborats enfront a epítops lineals de la proteïna i són, per tant, incapaços de distingir entre la forma cel·lular i resistent de la PrP. Les diferents tècniques que s'apliquen, doncs, per a la detecció de PrPres inclouen un pas on es destrueix la PrP^C o se n'elimina el marcatge. S'ha publicat la creació d'anticossos dirigits cap a epítops conformacionals que permeten diferenciar la forma resistent usant tècniques d'immunoprecipitació (10). Sembla, però, que tan sols funciona en teixit fresc i no quan l'hem fixat en formol i inclòs en parafina (segons els resultats del nostre laboratori).

L'estudi del dipòsit de PrPres mitjançant tècniques d'immunohistoquímica en teixits fixats en formol i inclosos en parafina ha aportat molta informació sobre la patogènia de les EET. Permet, en primer lloc, una localització anatòmica i subcel·lular de la PrPres força precisa. Aquesta precisió es pot portar fins a l'àmbit d'òrgans intracel·lulars mitjançant tècniques de microscòpia electrònica (ME) i d'immunomarcatge amb partícules d'or. Altres aproximacions són la utilització de teixits congelats i seccionats amb criòtom i, finalment, les tècniques d'*histoblotting* que consisteixen en la transferència a una membrana de talls de teixit congelat. L'avantatge d'aquestes últimes és que permeten treballar amb la proteïna sense fixar (en fresc) mentre es manté l'anatomia del teixit (141).

En el nostre cas hem treballat amb dues aproximacions:

- Teixit en fresc conservat en congelació: s'ha utilitzat per aplicar tècniques bioquímiques de detecció de la PrPres: el WB i un assaig immunològic en microplaca amb quimioluminiscència.
- Teixit fixat en formol i inclòs en parafina al qual hem aplicat tècniques d'immunohistoquímica per detectar la PrPres i, com es comentarà més endavant, altres marcadors d'interès per estudiar la patogènia de les EET.

Els estudis del dipòsit de PrPres mitjançant IHQ i ME han posat en evidència diferents patrons d'immunomarcatge de la PrPres que representen la infecció i el subsegüent acúmulo intracel·lular i/o alliberament de la PrPres als espais extracel·lulars adjacents als diferents tipus cel·lulars (73, 142). Trobem patrons que s'associen a neurones (per exemple intraneuronal, perineuronal o sinàptic, linear o axonal...) i d'altres a cèl·lules glials (intraglial, estrellat...). L'estudi d'aquests patrons permet determinar el paper que juga cada tipus cel·lular en la patogènia d'aquestes malalties. Si l'estudi es

INTRODUCCIÓ

complementa amb tècniques de MET es poden treure conclusions sobre el processament subcel·lular de la PrPres (143). L'ús d'anticossos dirigits contra diferents epítops de la PrPres també ha permès deduir que en les diferents localitzacions de la PrPres trobem diversos fragments o potser *conformers* (72).

En ovelles afectades de TO i, experimentalment amb EEB, l'estudi d'aquests patrons ha revelat diferències entre animals pel que fa a la distribució dels diferents patrons en les diverses àrees encefàliques i també dins del teixit limfoide. Aquestes diferències es podrien explicar a partir de diferents *soques* de l'agent infeccios (72, 144) o del genotip de l'hoste (73).

Un dels inconvenients més evidents de les tècniques d'immunodetecció de la PrPres és el fet que la majoria dels anticossos que s'han desenvolupat enfront de la PrP reconeixen indistintament la isoforma patològica i la cel·lular, ja que es tracta d'anticossos dirigits contra epítops lineals de la proteïna i la seqüència lineal d'aminoàcids de la PrPc és, recordem-ho, igual que la de la PrPres. S'ha publicat l'elaboració d'algun anticòs conformacional (10) però en tècniques d'IHQ no funciona. Ha calgut confiar en l'aplicació de combinacions de pretractaments (àcid fòrmic, digestió amb proteïnasa K, tractament de pressió i temperatura a pH àcid...). Aquests redueixen el marcatge de la PrPc i exposen epítops de la forma resistent. Ens basem també en el reconeixement de patrons de marcatge específics de la forma resistent per diferenciar-la de la cel·lular.

2.4.3. Les conseqüències

Les EET s'estudien com a malalties neurodegeneratives ja que, sobretot en els humans, el que més es manifesta és la degeneració final de les neurones. Això fa que se centri sovint l'estudi en aquest tipus cel·lular i s'entenguin com a secundaris els canvis en d'altres tipus cel·lulars com ara les cèl·lules glials. Un cop més, estudis en models transgènics han aportat informació força interessant i que relativitza el paper de les neurones. Com s'ha mencionat abans, els animals PrPc KO (es tracta de ratolins transgènics dels quals s'ha extret el gen Prnp i, per tant, no sintetitzen PrPc) són resistents a la infecció per PrPres (33). Ara bé, aquesta susceptibilitat es recupera si sobre una base KO de PrPc fem que la PrPc s'expressi exclusivament en neurones (145). Encara és més interessant, però, el fet que, si fem que la PrPc s'expressi exclusivament en astròcits (amb el promotor de la GFAP), els animals PrPc KO també recuperen aquesta susceptibilitat (146). Aquest resultat iguala en importància els papers tant de la població neuronal com de l'astroglial. D'altra banda, s'ha demostrat que l'expressió de PrPc sota el promotor de l'MBP (proteïna bàsica de la mielina), és a dir, exclusivament en oligodendròcits i cèl·lules de Schwann, no permet recuperar la susceptibilitat a la infecció amb PrPres (147).

INTRODUCCIÓ

A continuació comentarem els canvis més importants descrits associats al dipòsit de PrPres.

2.4.3.1. Resposta cel·lular

La gliosi o proliferació i hipertròfia de cèl·lules glials està descrita com una de les característiques comunes a totes les encefalopaties que cursen amb un dipòsit de PrPres, tant humanes com animals (4, 148). En aquest apartat intentarem recollir les evidències que relacionen la població glial amb la patogènia de les EET.

La IHQ ha estat un eina molt valuosa per a l'estudi de la resposta glial en el camp de la neuropatologia, especialment la detecció de la proteïna àcida fibril·lar glial per estudiar els astròcits fibril·lars (149). En el cas de la micròglia és més complicat trobar marcadors tan versàtils com la GFAP. S'ha descrit el CD68, un receptor de membrana de macròfags (150). Una de les aproximacions que s'han posat en marxa és la utilització de tècniques d'histoquímica d'afinitat utilitzant lectines, proteïnes d'origen vegetal, que mostren afinitat per sucres. Les cèl·lules de la micròglia presenten certs sucres (N-acetil galactosamina per exemple) a la seva superfície que en permeten la detecció (151, 152).

Astròcits: l'astrocitosi (proliferació i hipertròfia d'astròcits) és un dels canvis que es descriuen de forma consistent en moltes EET i, en particular, a l'EEB (4). S'han demostrat dipòsits de PrPres en astròcits en TO (153, 154) i en models murins de TO (155) mitjançant tècniques de col·localització per IHQ. Fins avui, no s'ha demostrat colocalització en EEB, tot i que la resposta astrocitària sí que està ben documentada (156, 157). Hi ha evidències que posen de manifest que el paper dels astròcits és clau en la patogènia de les EET ja que en ratolins KO de PrPc, és suficient expressar aquesta PrPc en astròcits perquè recuperin la susceptibilitat a ser infectats per prions (146). De fet, en aquest tipus de model també es poden observar les lesions neuronals típiques de les EET (158). La reacció astrocitària, en la TO, s'associa al dipòsit de PrPres i precedeix a l'aparició de lesions espongiformes (155, 159, 160). Això és especialment rellevant si pensem que en moltes malalties neurodegeneratives es descriu l'astrogliosi com a resposta a la neurodegeneració, però no abans que aquesta es produeixi. Estudis en cultius cel·lulars indiquen alguns dels mecanismes pels quals es podria explicar el paper dels astròcits en la patogènia de les EET. La presència de PrPres disminueix la capacitat dels astròcits de recaptar glutamat (56), aquest és un neurotransmissor excitatori responsable de processos d'excitotoxicitat en neurones. S'ha descrit que la PrPc en els astròcits protegeix a les neurones enfront a la toxicitat per coure (161). També en cultiu cel·lular s'ha demostrat que astròcits infectats amb PrPres, a través de citocines, activen el reclutament de cèl·lules de la micròglia (162).

INTRODUCCIÓ

Micròglia: de la mateixa manera que els astròcits, la micròglia també expressa RNA missatger de la PrPc (163, 164). Així mateix, en TO s'ha demostrat que conté dipòsits de PrPres (72, 153). En rosegadors s'han identificat dipòsits de PrPres en cèl·lules de la micròglia (165). En models de TO amb rosegadors hem vist que la micròglia suposa un component importat de la gliosi (166). En cultius cel·lulars s'ha vist que la PrPres o pèptids seus són capaços d'induir proliferació d'astròcits i micròglia. De fet, sembla que la proliferació dels astròcits depèn de la presència de cèl·lules de la micròglia activades (que alliberarien interleucines 1 i 6, responsables de l'activació dels astròcits); però sempre és necessari que aquests astròcits expressin PrPc i entrin també en contacte amb la PrPres (160). Estudis en la MCJ donen a la micròglia un paper important en la dispersió de l'agent dins del sistema nerviós central; tot i presentar baixos nivells de PrPres, la infectivitat de la micròglia aïllada és comparable a la dels homogenats d'encèfal (167). Aquest mateix grup demostra que l'activació d'RNA missatgers en la micròglia difereix de la que s'observa en altres processos com l'Alzheimer i d'algunes infeccions bacterianes. En cultius cel·lulars s'ha vist que, en presència de PrPres, les neurones i astròcits recluten a les cèl·lules de la micròglia mitjançant l'expressió de citocines (RANTES/CCL5 i MIP-1 β /CCL4 respectivament) (162). A més a més, la micròglia provoca neurotoxicitat activant vies apoptòtiques en les neurones (162). No hem trobat a la literatura descripcions de la reacció microglial en relació amb l'EBB.

Oligodendròcits: alguna publicació apunta cap a una implicació important dels oligodendròcits en la patogènia de l'MCJ (168). De fet, hi ha estudis que demostren que una proporció important de l'mRNA de la PrPc que s'expressa al SNC prové d'aquest tipus cel·lular (163). Recentment, s'ha descrit que la ctmPrP (forma transmembrana de la PrPc amb l'extrem C-terminal orientat a l'exterior) indueix apoptosi en cultius d'oligodendròcits (169). D'altres, però, sense voler restar importància al paper dels oligodendròcits, demostren que aquest tipus cel·lular presenta una resistència intrínseca a la infecció per prions (147).

2.4.3.2. Fenòmens d'estrès oxidatiu

Es defineix l'estrès oxidatiu com un desequilibri entre els processos bioquímics que produeixen espècies reactives d'oxigen (ROS, de l'anglès: *reactive oxygen species*) i la cascada cel·lular antioxidant. Aquestes ROS provoquen alteracions moleculars que desemboquen en la fallida de processos biològics i, finalment, la mort cel·lular (170). Aquestes alteracions moleculars es poden resumir (171):

- Oxidació de proteïnes: causa una alteració de l'activitat dels enzims o, fins i tot, provoca canvis conformacionals en proteïnes estructurals. Un marcador de l'oxidació de proteïnes és la

INTRODUCCIÓ

detecció de residus de tirosina nitrats mitjançant anticossos antinitrotirosina.

– Oxidació de lípids: pot desembocar en el trencament de la membrana plasmàtica i la d'òrgans intracel·lulars. Són indicadors d'aquests processos substàncies com el malonaldehid o el 4-hidroxinonenal.

– Oxidació d'àcids nucleics: causant de possibles mutacions. Un marcador d'aquest fenomen és la detecció de 8-hidroxi-2-guanosina.

Les ROS s'originen en l'oxigen (O_2) que les reductases transformen en superòxid ($O_2\cdot$). Aquest és transformat per enzims com la superòxid dismutasa (SOD), enzim dependent d'ions metàl·lics, en peròxid d'hidrogen (H_2O_2) que és menys agressiu i pot ser transformat en la innòcua molècula d'aigua (H_2O) per enzims com la catalasa o altres peroxidases com la glutatió peroxidasa (GSH Px). En presència d'ions metàl·lics com el ferro o el coure, es pot transformar el peròxid d'hidrogen en el radical hidroxil ($OH\cdot$) (reacció de Fenton) que és molt tòxic. La sintasa d'òxid nítric (NOS) genera, a partir de l'arginina, l'òxid nítric (NO). Aquest conegut neurotransmissor en combinació amb el superòxid generen el tòxic peroxinitrit ($ONOO\cdot$). (171, 172) En diverses malalties neurodegeneratives (alzheimer, parkinson o esclerosi amiotròfica lateral) s'ha descrit un augment dels nivells de ROS a l'encèfal (171, 172).

Estudis en models experimentals de TO i en casos naturals d'EET humanes han evidenciat que els fenòmens d'estrès oxidatiu estan implicats en la patogènia d'aquestes malalties i han demostrat la presència d'oxidació de proteïnes i d'àcids nucleics (173, 174). S'ha demostrat un increment dels fenòmens d'estrès en els ratolins *knockout* pel gen Prnp (175, 176).

Normalment, el desequilibri que causa l'estrès oxidatiu es deu o bé a un augment de ROS/NOS o a una disminució dels enzims antioxidants. En el cas de les EET sembla que es tracta d'una combinació de totes dues, d'una banda la PrPres induiria la producció d'ROS i, la falta de PrPc, resultaria en una disminució de les funcions antioxidants (associades a l'activitat superòxid dismutasa) que se li atorguen (177, 178).

Les metal·lotioneïnes són una família de proteïnes riques en residus cisteïna i amb capacitat per lligar ions metàl·lics monovalents i divalents (179). A causa d'aquesta afinitat pels metalls se'ls atribueixen funcions de detoxificació de metalls pesants. Al SNC les metal·lotioneïnes del tipus I i II s'expressen sobretot en astròcits i en cèl·lules de la microglia activades; les del tipus III presenten una expressió confinada al sistema nerviós pròpia de neurones (179). S'ha descrit que l'expressió de metal·lotioneïnes I i II s'indueix amb

INTRODUCCIÓ

la presència d'espècies reactives d'oxigen i nitrogen. La producció d'aquestes es veu potenciada per l'alliberament de ions metàl·lics, com el coure, que es dona durant el processos de neuroinflamació (179). Com s'ha comentat prèviament, la PrPc està implicada en el metabolisme del coure i en el manteniment de l'equilibri redox que envolta les neurones (161, 180-183). En el context de les malalties prioniques humanes s'ha descrit la inducció de l'expressió de metal·lotioneïnes en els estadis primerencs de l'MCJ (184), situació que es repeteix en múltiples processos neurodegeneratius com la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Pick o l'esclerosi amiotròfica lateral (155, 185-187). En el cas de l'EEB hi ha un grup que descriu un increment de l'immunomarcatge d'MT I+II a la medul·la espinal de vaques afectades d'EEB (188).

2.4.3.3. Alteració de les xarxes perineuronals

La matriu extracel·lular està formada principalment per proteoglicans; aquests estan formats per una glicoproteïna central a la qual s'uneixen cadenes de glicosaminoglicans (GAG) (189). Els GAG més abundants al sistema nerviós són els condroitin sulfats i els heparan sulfats. Un altre GAG important és el hialuronà, que no conté grups sulfat (189).

Els proteoglicans formats per condroitin sulfats (CSPG) inclouen un grup de proteoglicans anomenats hialectans o lecticans per la seva particularitat d'unir-se, per l'extrem N-terminal, a molècules de hialuronà i, per l'extrem C-terminal, mitjançant un domini tipus lectina, a altres proteïnes o a residus glucosídics (hialuronà + lectina = hialectà). Dins d'aquest grup trobem, entre altres: brevica, neurocà, versicà i agrecà. Cadascun pot presentar variants degudes a fenòmens d'empalmament (*splicing*) diferencial. La majoria es troben a l'espai extracel·lular, exceptuant-ne una variant del brevica, que pot estar ancorada a la membrana plasmàtica mitjançant una àncora glicosil-fosfatidil-inositol (GPI). Per la seva interacció amb l'hialuronà i altres proteïnes de la matriu, com la tenascina, es creu que tenen un paper important en l'estabilització de la matriu extracel·lular. Altres funcions que se'ls atribueixen són les de modular l'adhesió i migració cel·lular i la neuritogènesi, motiu pel qual tenen un paper molt important en el desenvolupament (189, 190). Els CSPG estan formats per residus de galactosamina, que podem detectar mitjançant l'aglutinina de *Wisteria floribunda*. S'ha comprovat que la seva distribució al sistema nerviós central és àrea específica (191). Fins i tot s'ha relacionat amb subpoblacions neuronals específiques, les gabaèrgiques (192) i també amb les glutamatèrgiques, en concret, amb aquelles inhibides per la gabaèrgiques i que, per tant, són riques en receptor GABA (193).

INTRODUCCIÓ

Dins del grup dels heparan sulfat proteoglicans (HSPGs) trobem els sindecans, que són proteoglicans transmembrana i els glicoplicans, que es troben a la membrana plasmàtica, ancorats mitjançant un GPI. En aquest sentit presenten certa similitud amb la PrP cel·lular. El HSPG interaccionen amb diversos tipus de molècules com ara factors de creixement, molècules de la matriu (hialuronà, tenascina...) i molècules de superfície cel·lular, com la laminina, o molècules d'adhesió cel·lular neuronal tipus N-CAM (190). Igual que els CSPG, estan implicats amb el desenvolupament i també se'ls atribueixen funcions de modulació de fenòmens de transducció de senyal ja que s'ha descrit que poden oligomeritzar lligands d'aquesta manera faciliten la dimerització dels corresponents receptors; aquest mecanisme està molt ben descrit en el cas del factor de creixement de fibroblasts (FGF) (190).

Una forma especialitzada de la matriu extracel·lular al sistema nerviós són les xarxes perineuronals. Són riques en hialuronà, CSPG i glicoproteïnes de matriu com la tenascina. La funció d'aquestes xarxes, descrites ja a finals del segle XIX per Santiago Ramon y Cajal i Camillo Golgi, consisteix en l'estabilització de les sinapsis, la concentració de factors de creixement i la relació de la matriu extracel·lular amb components del citoesquelet. Els components de les xarxes els sintetitzen tant les neurones com cèl·lules glials: astròcits i oligodendròcits (194). Per estudiar la matriu extracel·lular, tant en EEB com en TO, hem utilitzat un marcador de les xarxes perineuronals, l'aglutinina de *Wisteria floribunda* (191, 195, 196).

La PrPc es localitza a la membrana plasmàtica encarada a l'espai extracel·lular, interactuant amb components de la matriu extracel·lular; entre els quals amb els HSPG (50, 197), amb la laminina i amb el seu receptor (52, 198). La unió de la PrPc a GAGs sembla que depèn d'ions divalents (50). La PrPc, com hem comentat prèviament, s'ha associat a creixement de neurites i a fenòmens de plasticitat neuronal (49, 52). La disrupció de les xarxes perineuronals s'ha descrit en presència de PrPres en casos d'MCJ en humans (195) i els dipòsits de PrPres s'han associat als HSPG (199-202). També hi ha evidències in vitro que els HSPG poden induir la formació de PrPres (203).

Així doncs tant per la localització dels dipòsits de PrPres com per la interacció que la PrPc presenta amb components de la matriu extracel·lular, és evident que aquest compartiment juga un paper important en la patogènia de les EET.

2.4.3.4. Alteració de la mecànica sinàptica

La neurotransmissió química consisteix en una sèrie de processos que comencen amb la síntesi dels neurotransmissors per part de la neurona presinàptica, i en el seu emmagatzematge, o dels seus

INTRODUCCIÓ

corresponents precursors, a la terminal presinàptica. Per això cal que siguin emmagatzemats en vesícules sinàptiques mitjançant proteïnes transportadores. Aquests neurotransmissors seran alliberats a l'espai sinàptic, on interaccionaran amb els seus corresponents receptors per generar una determinada resposta. La seva acció serà finalitzada o bé de forma activa (recaptació dels neurotransmissors per part de la mateixa neurona o per cèl·lules glials) o passiva, per exemple, per difusió del neurotransmissor (204).

Les vesícules sinàptiques, igual que altres orgànuls recoberts de membrana, s'originen a l'aparell de Golgi. Al soma neuronal s'uniran a motors moleculars del tipus kinesina (ATPases) que s'encarregaran de transportar-les al llarg de l'axó, associades a components del citoesquelet (microtúbuls), conformant el que es coneix com a transport axonal anterògrad ràpid (205). Un cop alliberat el neurotransmissor la vesícula sinàptica pot ser reciclada per a la seva reutilització immediata a la terminal sinàptica o bé pot ser transportada, via transport axonal retrògrad; aquest transport també s'associa a motors moleculars, del tipus dineïna.

Durant l'alliberament dels neurotransmissors a l'espai sinàptic, la vesícula sinàptica recorre un cicle que comença amb un potencial d'acció que provocarà l'obertura dels canals de calci (Ca^{2+}) de la membrana plasmàtica. Això desencadenarà un augment de Ca^{2+} al citoplasma que provocarà l'exocitosi de les vesícules sinàptiques que alliberaran els neurotransmissors. Aquestes vesícules seran reciclades i es reompliran amb més neurotransmissors. La fusió (obertura de porus) de les vesícules a la membrana plasmàtica implica que prèviament hi ha hagut un reclutament de vesícules al terminal presinàptic, que constitueix un *pool de reserva*. Aquestes vesícules s'ancoren a l'anomenada zona activa de la sinapsi i abans que es pugui donar la seva fusió (figura 4), mitjançada per Ca^{2+} , amb la membrana presinàptica cal que s'activin per passar a formar part del *pool de vesícules llestes per ser alliberades*. Quant al reciclatge es proposen tres vies: la de *besar i quedar-se* (*kiss and stay*) per la qual les vesícules no perden l'ancoratge a la membrana i són reomplertes allí mateix. La via de *besar i marxar* (*kiss and run*) en aquest cas les vesícules sí que perden l'ancoratge però són reomplertes al mateix *pool de reserva*. Finalment, la via d'endocitosi, per vesícules que es fusionen totalment a la membrana mitjançant un embolcall de clatrina (206).

Hi ha tota una sèrie de proteïnes que anomenem proteïnes sinàptiques que regularan la fusió de la vesícula amb la membrana sinàptica i el seu reciclatge. En aquest grup trobem les proteïnes que formaran el complex SNARE (receptor de les proteïnes SNAP o proteïnes d'adhesió NSF, que és el factor sensible a N-etilmaleimida soluble). Es diferencien les v-SNARE (proteïnes SNARE associades a membrana vesicular) com la sinaptobrevina (o VAMP, proteïna de

INTRODUCCIÓ

membrana associada a vesícula) de les t-SNARE (associades a la membrana diana o *target membrane*), dins d'aquest grup trobem la syntaxina i la SNAP-25 (coneguda també com a proteïna de 25KDa associada a sinaptosoma). Aquestes dues proteïnes juntament amb al sinaptobrevina formaran el complex SNARE, que unirà la vesícula sinàptica amb la membrana presinàptica. La sinaptobrevina interactua amb la sinaptotagmina, una altra proteïna de vesícula, que és capaç d'unir Ca^{2+} ; quan ho fa, provoca la fusió de la membrana de la vesícula amb la del terminal presinàptic i així es permet l'alliberament de neurotransmissors. Aquesta unió és regulada per moltes proteïnes, entre les quals, per la sinaptofisina, que també es troba a membrana de la vesícula i forma heterooligòmers amb la sinaptobrevina; d'aquesta manera s'evita que aquesta es fusioni amb les t-SNARE. També trobem altres proteïnes sinàptiques com les sinapsines, que regulen la unió de la vesícula a components del citoesquelet, o les Rab, implicades també en el control del procés d'exocitosi (206).

Per a l'estudi de les proteïnes sinàptiques hem escollit anticossos per detectar la sinaptofisina, una proteïna de vesícula, i la SNAP-25, de membrana presinàptica. Ambdues presenten els epítops força conservats la qual cosa ens permetrà establir comparacions entre diferents espècies.

Estudis amb el mètode de Golgi (207, 208) en primer lloc, i més endavant tècniques aplicades al microscopi confocal (209) van demostrar en l'MCJ i la TO, respectivament, una pèrdua d'espines dendrítiques que precedeix a la mort neuronal. En la MCJ s'ha descrit que la PrPres es diposita als espais sinàptics (210); a més a més, s'han descrit alteracions en l'expressió de proteïnes sinàptiques (211-213). Estudis en altres models murins de TO havien demostrat també alteracions de les sinapsis (214-216). D'una banda s'ha descrit pèrdua de sinapsi basant-se en comptatges ultraestructurals de botons sinàptics (214). D'altra banda, s'han descrit una alteració de l'expressió de diverses proteïnes sinàptiques, avaluades mitjançant tècniques d'immunohistoquímica, associada amb possibles alteracions del seu transport axonal (166, 212), en aquests estudis s'ha demostrat la presència anormal d'aquestes proteïnes al citoplasma del soma neuronal o a l'interior de torpedes axonals.

En casos d'EEB no s'han descrit canvis en l'expressió de proteïnes sinàptiques (156, 217) o bé canvis molt lleus (157).

Com hem comentat abans, la relació funcional de la PrPc amb la sinapsi és molt estreta, ja que aquesta proteïna és abundant a nivells de les sinapsis, localitzada a les membranes presinàptica i postsinàptica (47, 48). S'ha demostrat que és necessària per una funció sinàptica normal (53) i es creu que juga un paper protector enfront de l'estrès oxidatiu mitjançant per coure (209).

INTRODUCCIÓ

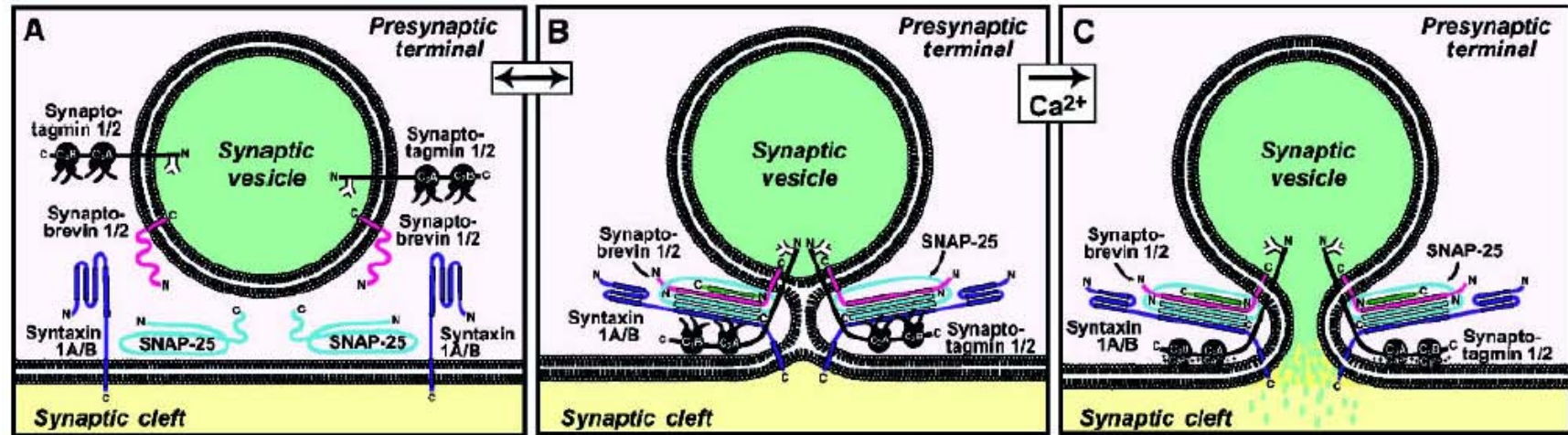


Figura 4. Model de fusió de la vesícula sinàptica al terminal presinàptic.

En el gràfic A veiem un vesícula ancorada on encara no hi ha cap interacció entre SNARE i sinaptotagmina. En el B, la vesícula ha estat activada, s'han format els complexos SNARE entre sinaptobrevina, SNAP-25 i sintaxina; això ha fet que les membranes de la vesícula i presinàptica s'aproximessin tot creant-se un intermediari inestable. En el gràfic C l'entrada de ions de calci desestabilitza aquest intermediari que acaba fusionant-se amb la membrana. Sembla que l'entrada de calci faria que els dominis C₂ de la sinaptotagmina passessin d'estar units a la sinaptobrevina a estar-ho als fosfolípids de la membrana presinàptica causant la pertorbació mecànica responsable de la fusió (206) (*synaptic cleft*: espai sinàptic).

INTRODUCCIÓ

2.4.3.5. Mort neuronal, mecanismes

Les neurones poden trobar la seva fi en un procés de necrosi si són víctimes d'insults sobtats, com per exemple una isquèmia aguda. Es tracta d'un procés caòtic, a resultes de circumstàncies externes a la cèl·lula, que inclou un edema cel·lular, trencament de la membrana citoplasmàtica, alliberament de components cel·lulars i que genera una resposta inflamatòria tissular. D'altra banda, el fat d'una neurona pot ser la *mort cel·lular programada* (MCP); consistent en processos actius cel·lulars, dependents d'energia (ATP), mitjançats per senyals intracel·lulars i que no generen una resposta inflamatòria (218). Se solia parlar de l'apoptosi com a un sinònim de l'MCP, però se n'han anat definint altres tipus. Existeixen diverses classificacions, però d'una forma genèrica es pot parlar de tres tipus definits d'MCP:

– MCP I o apoptosi: consisteix en l'activació d'una cascada de cisteïna-proteases (caspases) que pot ser iniciada per diferents vies; les més rellevants són: la via mitocondrial, que inclou alliberament de citocrom C de l'espai intermembranós del mitocondri i la via del receptor de mort cel·lular per la qual lligands específics activaran receptors de mort cel·lular (del tipus TNFR, FAS...). Les diferents vies convergeixen en un efector comú, la caspasa 3, i desemboquen en un catabolisme del citoesquelet (encongiment del citoplasma) i en l'activació d'endonucleases que fragmentaran el DNA (condensació de la cromatina). Llavors es formen gemmes o cossos apoptòtics que presenten senyals a membrana (fosfatidilserina) per ser fagocitats.

Hi ha altres vies de PCM de tipus apoptòtic però que no depenen de l'activació de caspases. Per exemple, la mort cel·lular mitjançada per AIF (factor inductor d'apoptosi, un proteïna mitocondrial); la mort per catepsines que són proteases lisosomals o bé per les calpaines, proteases citoplasmàtiques activades per Ca^{2+} alliberat des del reticle endoplasmàtic.

– MCP II o autofàgia: formació de vesícules citoplasmàtiques autofàgiques que es fusionen amb lisosomes (autofagolisosomes). L'autofàgia es coneix també com un mecanisme de supervivència cel·lular quan falten nutrients, com un mecanisme per reciclar components cel·lulars prescindibles.

– MCP III, MCP citoplasmàtica o paraptosi: és dona una dilatació (vacuolització) dels òrgans intracel·lulars (reticle endoplasmàtic i mitocondris). Morfològicament és més semblant a la necrosi. Regulat per les MAP kinases i activat per receptors de la família TNFR (receptor del factor de necrosi tumoral) i ILGFR (receptor del factor de creixement de tipus insulina).

La mort cel·lular programada es creu que té els seus orígens en fenòmens evolutius per millorar la supervivència dels organismes enfront a la infecció de les seves cèl·lules per part de patògens, com ara els virus. L'MCP té una importància capital en el

INTRODUCCIÓ

desenvolupament de l'organisme i, en particular, del sistema nerviós. Els mecanismes pels quals es regula l'MCP són molt complexos i depenen d'un equilibri de factors de supervivència cel·lular (neurotrofines, factors de la matriu extracel·lular com la laminina, hormones, activitat sinàptica de les neurones, factors dependents de l'òrgan diana que innerven, factors de les cèl·lules glials) i de mort cel·lular (factors inductors d'apoptosi, manca de factors de supervivència, patògens). En molts processos neurodegeneratius s'han descrit fenòmens d'MCP (218-220). L'MCP, com altres processos fisiològics, mal regulada pot desembocar en processos patològics: de fet, s'ha vist que en algunes malalties neurodegeneratives, com en l'atròfia muscular espinal, hi ha implicats processos d'MCP (218).

La mort neuronal ha format part sempre de les lesions que caracteritzen les EET en general i, en particular, l'EEB i la TO (4, 94, 221). Tot i així, els mecanismes que la provoquen no estan encara ben definits.

S'han publicat evidències que l'apoptosi participa en la pèrdua neuronal en models murins de TO (166, 222-226). La típica fragmentació del DNA en escala, característica de l'apoptosi, s'ha observat en casos d'EEB i TO natural (227, 228). Altres tècniques de detecció d'apoptosi com la ISEL (*in situ end labelling*: marcatge d'extrem de DNA fragmentat sobre teixit) han demostrat cèl·lules apoptòtiques en l'MCJ (229) i en models murins de TO (166). En cultius cel·lulars s'ha vist que pèptids de la PrP causen apoptosi (230). De totes maneres s'ha qüestionat la rellevància que pugui tenir l'apoptosi en la patogènia de les EET (231).

S'ha demostrat en models murins d'EET, bàsicament per microscòpia electrònica, la presència de vacúols autofàgics (232-235). Això no ha estat possible en casos naturals de TO ni pacients humans terminals d'EET (219) o tan sols en un grau molt lleu. D'altra banda, l'aparença vacuolada de les neurones que ha donat el nom d'encefalopaties espongiformes a les malalties que estem estudiant s'assimila a l'MCP III, de fet, s'ha suggerit que els vacúols poden tenir el seu origen en orgànuls dilatats (mitocondris, reticle endoplasmàtic) (236).

2.4.3.6. Efectes sobre les poblacions neuronals

Les alteracions clíniques observades en l'MCJ com poden ser convulsions o contraccions musculars involuntàries i el tremolor descrit en EET animals es poden explicar com un desequilibri en la innervació inhibidora central (237).

Aquest fet ha generat un interès per l'estudi de les subpoblacions neuronals inhibidores en relació amb les EET. Així, en EET humanes

INTRODUCCIÓ

s'ha descrit una vulnerabilitat selectiva d'una d'aquestes poblacions: les neurones que utilitzen el neurotransmissor inhibitori acid gamma-aminobutíric (GABA) (195, 237-239). Aquest tipus d'observació ha estat corroborada, d'una banda, en models experimentals de TO en rosegadors (240) però, d'altra banda, ha estat descartada (241). Com hem comentat en seccions anteriors, dins de la seqüència de fets que succeeixen en la neurodegeneració induïda per prions trobem, en primer lloc, una alteració de les espines dendrítiques (242) amb pèrdua de sinapsi (214) que precedeix la pèrdua neuronal. En el cas de les poblacions gabaèrgiques, en models experimentals de TO, s'ha confirmat que sí que existeix una pèrdua d'aquest tipus de neurones i que aquesta és precedida per una pèrdua dels botons sinàptics que contenen l'anomenat neurotransmissor. Però aquesta seqüència de fets sembla que no és exclusiva d'aquesta subpoblació, ja que ocorre de manera semblant en subpoblacions neuronals no gabaèrgiques (243).

OBJECTIUS DE LA TESI
DOCTORAL

O B J E C T I U S D E L A T E S I D O C T O R A L :

Estudi de la patogènia de l'encefalopatia espongiforme bovina i de la tremolor ovina en casos de camp

L'objectiu general del treball de recerca d'aquesta tesi doctoral és aprofundir en el coneixement de la patogènia de les encefalopaties espongiformes transmissibles, en particular, de l'EEB i la TO en casos de camp.

Per aconseguir-ho, ens hem basat en la hipòtesi de treball següent: demostrar la presència de canvis en el sistema nerviós central dels animals afectats de totes dues malalties, respecte d'animals sans.

A partir d'aquestes consideracions els objectius específics van ser els següents:

- Caracteritzar els casos que calia estudiar segons el protocol següent:
 - o Estudi histològic del perfil lesional encefàlic.
 - o Estudi de la distribució encefàlica del dipòsit de PrPres.
 - Analitzar els patrons d'immunomarcatge de PrPres sobre teixit per determinar possibles vies de disseminació de la PrPres dins l'encèfal.
 - o Determinar el perfil molecular de la PrPres per transferència Western.
 - o Comparar l'efectivitat de les diferents tècniques d'anàlisi aplicades (proves ràpides vs immunohistoquímica) i determinar la seva aplicabilitat als estudis de patogènia.

- En el cas de l'EEB, determinar la implicació que tenen els següents paràmetres en els mecanismes que desencadenen la neurodegeneració:
 - o Resposta de les poblacions glials
 - o Fenòmens d'estrès oxidatiu
 - o Alteracions de les xarxes perineuronals
 - o Alteracions de la mecànica sinàptica
 - o Mecanismes de mort neuronal

- En el cas de la TO, avaluar canvis que ens permetin explicar la simptomatologia clínica observada:
 - o En la subpoblació neuronal gabaèrgica
 - o En les seves xarxes perineuronals

A continuació exposo els quatre treballs que constitueixen la tesi:

Treball núm. 1: Vidal E, Márquez M, Ordoñez M, Raeber A, Struckmeyer T, Oesch B, Siso S, Pumarola M. “Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests”. 2005 *Journal of Virological Methods*. 127: 24-32.

Treball núm. 2: Vidal E, Márquez M, Costa C, Tortosa R, Domènech A, Serafín A, Pumarola M. “Molecular profiling and comparison of field transmissible spongiform encephalopathy cases diagnosed in Catalunya”. 2006 Acceptat a *The Veterinary Journal*.

Treball núm. 3: Vidal E, Márquez M, Tortosa R, Costa C, Serafín A, Pumarola M. “Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages”.. 2006 *Journal of Virological Methods*. 134:15-29

Treball núm. 4: Vidal E, Bolea R, Tortosa R, Costa C, Domènech A, Monleón E, Vargas A, Badiola JJ, Pumarola M. “Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains”. 2005 Enviat a *Journal of Virological Methods*.

Treball núm. 1

Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests

Vidal E, Márquez M, Ordoñez M, Raeber A, Struckmeyer T, Oesch B, Siso S, Pumarola M.
2005 *Journal of Virological Methods* 127: 24-32.



Comparative study of the PrP^{BSE} distribution in brains from BSE field cases using rapid tests

E. Vidal^a, M. Márquez^b, M. Ordóñez^a, A.J. Raeber^c, T. Struckmeyer^c,
B. Oesch^c, S. Sisó^d, M. Pumarola^{a,b,*}

^a PRIOCAT Laboratory, CReSA, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain

^b BTAC, Animal Medicine and Surgery Department, Institut de Neurociències (INc), Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain

^c Prionics AG, Wagistrasse 27A, 8952 Schlieren-Zürich, Switzerland

^d Veterinary Laboratories Agency (VLA-Lasswade), Pentlands Science Park, Midlothian EH26 0PZ, Scotland, UK

Received 19 November 2004; received in revised form 23 February 2005; accepted 3 March 2005

Available online 9 April 2005

Abstract

The distribution of PrP^{BSE} in the brain of nine confirmed BSE field cases was analyzed using immunohistochemistry and compared to the levels of PrP^{BSE} determined by two rapid tests (Prionics[®]-Check WESTERN and Prionics[®]-Check LIA). Each brain was dissected into 16 areas: spinal cord, medulla oblongata, pons, mesencephalon, thalamus, hippocampus, cerebellar vermis, cerebellar medulla, cerebellar hemispheres, occipital cortex, temporal cortex, parietal cortex, striatum, frontal cortex, piriform lobe and olfactory bulbs. The highest levels of PrP^{BSE} were detected in the medulla oblongata, spinal cord and pons, and correspondingly both rapid tests showed 100% correlation with the immunohistochemistry with regard to sensitivity and specificity. Some inconsistencies between the levels of PrP^{BSE} determined either by immunohistochemistry or by the rapid tests were found in brain areas with medium to low levels of PrP^{BSE}. These brain areas included the cerebellar hemisphere, olfactory bulb, and the temporal and parietal cortices. A brain PrP^{BSE} distribution curve (BPDC) was designed by plotting the PrP^{BSE} signals obtained from the two rapid tests versus the anatomical region along the caudal-rostral axis of the brain. Comparison of the BPDC of the nine BSE cases showed that all cases had a similar PrP^{BSE} distribution in the brain but with variable intensities, which could be explained by different stages in the progression of the disease. We propose that the BPDC could be used as a tool to differentiate classical cases of BSE from the recently identified atypical BSE cases.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: BSE; PrPres; Western blotting; LIA; BPDC

1. Introduction

Bovine spongiform encephalopathy (BSE) is a fatal, acquired neurodegenerative disease in cattle, belonging to the group of transmissible spongiform encephalopathies (TSEs) or prion diseases. Since it was first recognized in the UK in 1986 (Wells et al., 1987), BSE has raised great public health

concerns because the BSE agent has been shown to cause variant Creutzfeldt–Jakob Disease (vCJD) in humans (Bruce et al., 1997; Collinge et al., 1996; Dillner, 1996; Ironside et al., 1996; Will et al., 1996). With the introduction of mandatory active surveillance programs in the European Union the need to develop rapid tests to diagnose the disease has become a high priority. Up to now, the European Union has approved five rapid tests based on the immunochemical detection of the protease resistant form of the prion protein (PrP^{BSE} or PrPres), which is the only reliable molecular marker for prion diseases (Prusiner, 1982). All five rapid tests for diagnosing BSE in cattle have been validated on post-mortem collected

* Corresponding author at: PRIOCAT Laboratory, CReSA, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 08193 Barcelona, Spain. Tel.: +349 35811433; fax: +349 35813142.

E-mail address: marti.pumarola@uab.es (M. Pumarola).

brain tissue from the medulla oblongata taken at the level of the obex. These tests are: the Prionics[®]-Check WESTERN (WB), the Prionics[®]-Check LIA (Luminiscence Immunoassay), the Bio-Rad TeSeE, the Abbott/Enfer BSE test and the InPro CDI (Conformation Dependent Immunoassay) (Moynagh et al., 1999; Regulation (EC), 2003; Schimmel et al., 2002).

By the middle of 2004 more than 33 million rapid tests had been performed in Europe within the mandatory rapid testing of all slaughtered cattle above the age of 30 months. In total, about 10 million BSE tests are performed per year in Europe and about one million in Japan.

The Prionics[®]-Check WESTERN (WB) was the first rapid test approved for monitoring BSE and has been used more than 20 million times worldwide (Cooley et al., 2001; Morignat et al., 2002; Schaller et al., 1999). Sandwich ELISA-based assays, such as the Prionics[®]-Check LIA (Biffiger et al., 2002), which allow high throughput sample testing were approved by the European Commission in 2002 (EUROPEAN COMMISSION, 2002).

In Catalonia, the Prionics[®]-Check WESTERN (WB) has been used for the routine diagnosis of BSE in cattle and scrapie in small ruminants within the mandatory surveillance and eradication plan for TSEs in Europe. Confirmation of positive cases identified by WB is carried out by means of histopathological examination (HP) and immunohistochemical (IHC) detection of PrP^{BSE} in formalin-fixed, paraffin embedded tissue in regional and national reference laboratories (Badiola et al., 2002; Haritani et al., 1994; Wells et al., 1989).

PRIOCAT (CRESA) is the regional reference laboratory for animal TSEs in Catalonia and in collaboration with the Animal Tissue Bank of Catalonia (BTAC, <http://quiro.uab.es/btac>) collects, processes, stores and studies the brains of all cattle diagnosed with BSE in the region. Since the first cases of BSE were diagnosed in Catalonia, we have performed analyses to determine the distribution of PrP^{BSE} in the brains of BSE positive animals (Sisó et al., 2004). The rationale for this study was to investigate the pathogenesis of BSE by studying the spread of PrP^{BSE} as a marker for the infectious agent within the brain, and to detect possible differences between individual BSE cases. Whereas

in the past such studies were performed by histology and immunohistochemical techniques, now with the availability of rapid tests, samples can be analyzed much faster and PrP^{BSE} levels can even be quantified using ELISA-based rapid tests.

In the present report, we have analyzed the distribution of PrP^{BSE} in 16 different brain areas of nine confirmed BSE cases using the Prionics[®]-Check WESTERN and Prionics[®]-Check LIA rapid tests. Quantification of the PrP^{BSE} signals allowed us to generate a PrP^{BSE} distribution curve (BPDC) by plotting the PrP^{BSE} signals obtained from the two rapid tests versus the anatomical brain region. The BPDC curve could be a valuable tool for identifying novel strains of the BSE agent.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Brains were collected at the slaughterhouse from cattle that were confirmed to have BSE from an analysis of the brainstem sample sent from the local laboratories. Brains of nine confirmed BSE cases and one healthy animal as a negative control (Table 1) were used in this study. One half of the brain was fixed in formalin while the contra lateral half was dissected into 16 brain areas as shown schematically in Fig. 1, and immediately frozen and stored at -80°C . The cases included in the present study were detected from the active TSE surveillance program, i.e. from animals that were in the human consumption chain. None of the cases, according to official veterinary services, presented any detectable clinical sign at the antemortem inspection except for case 9, which was sacrificed as an emergency due to a hind limb luxation. The agriculture department followed up the BSE focus after diagnosing each case; again no relevant clinical signs were reported in the conducted epidemiological survey.

2.2. Homogenization and protein quantification

A 10% (w/v) homogenate was prepared from 0.5 g of tissue from each brain area according to the instructions pro-

Table 1
Sample origin information

Case number	Dx	Specie	Breed	Population (m)	Age (years)	Sex	Post-mortem delay (h)
1	BSE	Bovine	Friesian	>30	5	Female	45–58
2	BSE	Bovine	Friesian	>30	4	Female	36–48
3	BSE	Bovine	Friesian	>30	7	Female	36–48
4	BSE	Bovine	Friesian	>30	7	Female	36–48
5	BSE	Bovine	Friesian	>30	6	Female	36–48
6	BSE	Bovine	Friesian	>30	8	Female	36–48
7	BSE	Bovine	Friesian	>30	7	Female	24–36
8	BSE	Bovine	Friesian	>30	5y + 6m	Female	48
9	BSE	Bovine	Friesian	Emergency	5y + 4m	Female	48
CTRL	–	Bovine	Friesian	>30 m	2.5	Female	1–3

Animal information: Dx: diagnostic; CTRL: control, healthy cow.

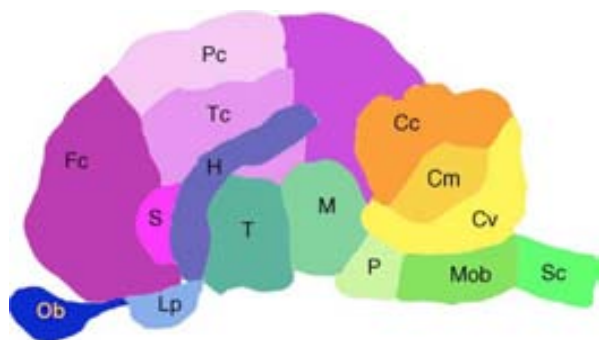


Fig. 1. Schematic representation of the 16 main brain areas dissected. Ob (olfactory bulbs and rostral olfactory peduncles), Lp (piriform lobe), H (hipocampus), Fc (frontal cortex), Tc (temporal cortex), Pc (parietal cortex), Oc (occipital cortex), S (striatum, includes caudate and lenticular nuclei), T (thalamus), M (mesencephalon), P (pons), Mob (medulla oblongata), Sc (spinal cord), Cv (cerebellar vermis), Cm (cerebellar medulla), Cc (cerebellar hemispheres).

vided by the manufacturer of the Prionics®-Check LIA (Prionics, Schlieren-Zurich, Switzerland). The total protein content was determined in a 1% (v/v) homogenate, which was diluted with distilled water to avoid interferences with protein quantification reagents. A 5 µl aliquot of the diluted homogenate was mixed with 250 µl of Coomassie reagent in a microtitre plate and after mixing for 30 s the OD at 570 nm was determined with a spectrophotometer (Lucy 3, Anthos, reference filter 450 nm). The protein concentration of the homogenates was determined using bovine serum albumin as a standard. The protein concentration of the 10% brain tissue homogenates was then adjusted to 6.06 mg/ml using LIA homogenization buffer as a diluent.

2.3. Western blotting and LIA

In a microplate incubator (W1036solo, Lab Systems Oy), a 100 µl aliquot of the homogenate was digested with proteinase K following the Prionics®-Check LIA protocol except that incubation was at 37 °C for 60 min. The digestion reaction was stopped by adding LIA Digestion Stop and 15 µl (containing 58.87 µg of total protein) of the digested homogenate was further treated following the LIA protocol, as specified by Prionics. For the Western blot, 100 µl of the digested homogenate was denatured with 62.5 µl of Sample Buffer from Prionics®-Check WESTERN and aliquots corresponding to 23.34 µg of the total protein were loaded onto each lane of an SDS-polyacrylamide gel.

The readings in the LIA were performed with a luminometer (Berthold). The values obtained by the Plate Luminometer were given as relative light units (RLU) and a cut-off value to distinguish positive samples from negative ones was calculated by the Prionics®-Check LIA Analysis software. The cut-off was calculated using both the negative controls included in the kit (negative control cut-off-NCC) and the samples, which gave negative results according to the NCC. These negative samples were then used to calculate the real

sample cut-off (RSC). Following the kit procedure to calculate the cut-off when there are too many positive samples on a single plate (as was the case in our study) generates a very high RSC. These in turn yield false negative results. For this reason, a cut-off was calculated as five times the mean of the negative control values.

2.4. Histopathology and immunohistochemistry

Formalin-fixed half-brains were dissected into the 16 brain areas which were inactivated in formic acid (98%) for 1 h and then embedded in paraffin. Four-micrometer sections were mounted on silanised microscope slides. The sections were deparaffinised, rehydrated and PrP^{BSE} was detected with the monoclonal antibody L42 (R-Biopharm 1:500) and 6H4 (Prionics, 1:3000) according to the protocol previously published (Sisó et al., 2002, 2004). The protocol used in this study is the one validated in our lab for TSE diagnostic confirmation. Sections were stained with haematoxylin and eosin to assess the presence of lesions associated with BSE.

2.5. Data analysis

A statistical analysis of the data was performed with the software OriginPro 7.0.

3. Results

3.1. Test comparison

The results from the immunohistochemistry (IHC) and histopathology analyses were used as a “gold standard” to evaluate the effectiveness of the rapid tests (WB and LIA) to detect PrP^{BSE} in the various brain areas. An area was considered positive according to the IHC analysis when lesions were observed by histopathology together with PrP^{BSE} deposition by IHC. However, in some areas where lesions were minimal or absent the positive result was exclusively based on IHC. A positive result according to IHC was assigned to those sections that showed fine punctuate, coarse granular, confluent, linear, intraneuronal, perineuronal and stellate immunoreactivity, all of which have been described

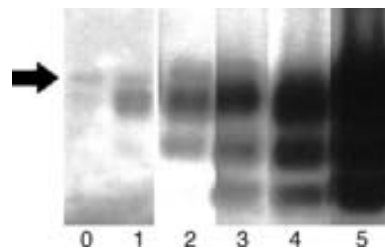


Fig. 2. Semiquantitative scoring of the Western blotting results. The arrow indicates the band corresponding to the proteinase K which runs at an apparent molecular weight of 30 kDa.

as being specific morphologic patterns of PrP^{BSE} deposition (Gonzalez et al., 2003; Jeffrey et al., 2003; Sisó et al., 2004). Even in the cases where just one of the patterns was observed and with a low intensity, a positive result was assigned. A healthy animal that was included in the study as a negative control did not show any PrP^{BSE} immunoreactivity patterns in any of the brain areas studied.

In the Western blot, the typical three-band pattern in the region of 18–30 kDa is characteristic for protease treated PrP^{BSE}. To perform a semiquantitative analysis of the data obtained by Western blot the PrP^{BSE} signals were given a score by eye of a numerical value from 0 to 5 according to the intensity of the three bands, with 5 for maximum and 0 for no detectable signals as shown in Fig. 2. Samples which showed only a single band in the molecular weight range of 27–30 kDa but no signals for the lower molecular weight bands were assigned a positive ranking of 1. A summary of the Western blot results of the nine positive cases is shown in

Fig. 3. No signals for protease resistant PrP^{BSE} were obtained for the healthy control animal.

On the medulla oblongata (Mob), the cranial cervical fragment of the spinal cord (Sc) and the pons (P), both LIA and WB showed a specificity and sensitivity of 100% compared to IHC as the ‘gold standard’. In other brain areas, the signals for PrP^{BSE} showed a higher degree of variability when comparing the results from the rapid tests and the IHC. The piriform lobe (Lp) of two animals (cases 2 and 3) and the parietal and frontal cortex of case 1 were clearly WB-positive (ranking of 2) but IHC-negative, whereas the temporal cortex of case 2 was IHC-positive but WB-negative (Table 2). However, these inconsistencies are probably due to uneven distribution of PrP^{BSE} in tissue samples. Furthermore, the rapid tests are optimized for detecting PrP^{BSE} in the obex and as such they could perform differently in other areas of brain tissues (Moynagh et al., 1999). A detailed comparison of the results of the nine BSE positive cases is shown in Table 2.

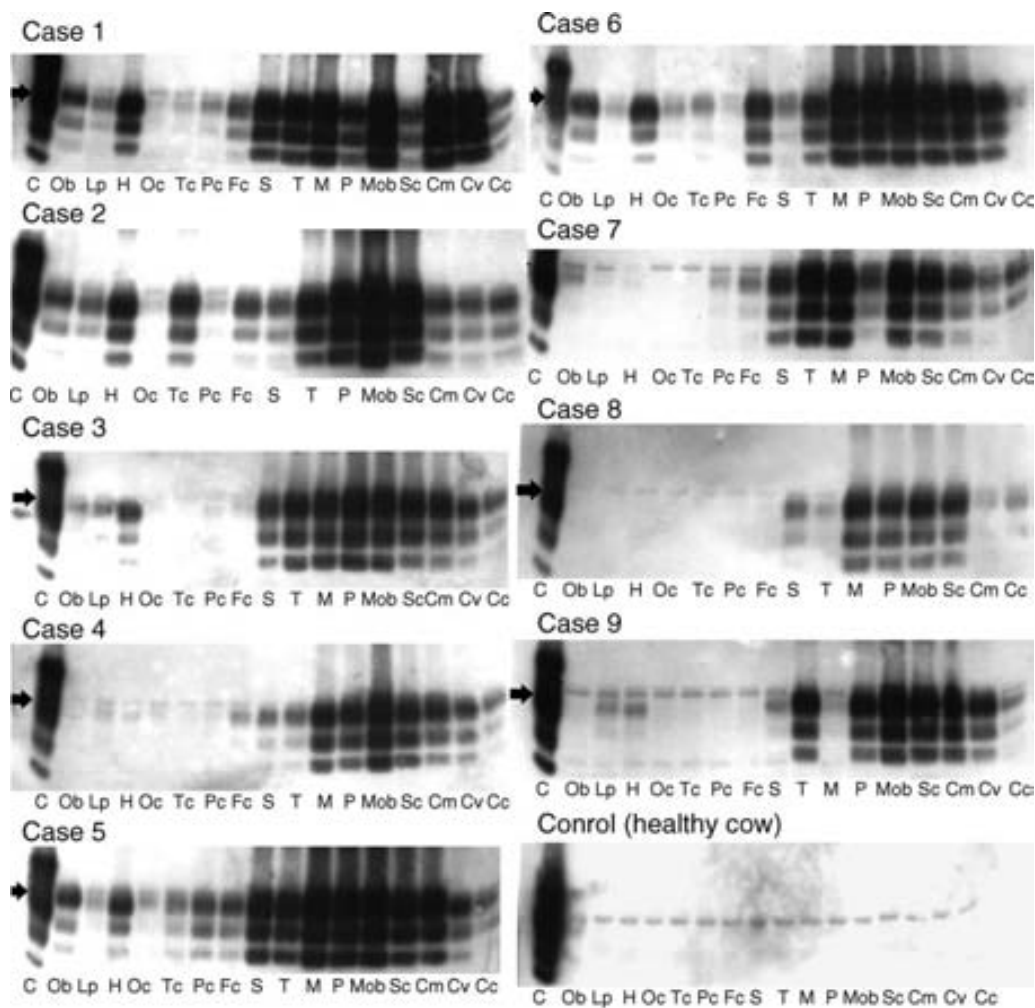


Fig. 3. Western blots of the brain areas of the nine BSE cases and one healthy control animal. The arrows indicate the band corresponding to the proteinase K which runs at an apparent molecular weight of 30 kDa. The first lane of each blot ‘‘C’’ contains the internal positive control from the Prionics[®]-Check Western. Abbreviations for the various brain areas are described in Fig. 1.

3.2. The Brain PrP^{BSE} Distribution Curve (BPDC)

To study the distribution of PrP^{BSE} within the brain, the semiquantitative WB scores and the LIA relative light units (RLU) for PrP^{BSE} were plotted against the anatomical region along the caudal-rostral axis of the brain. For that purpose, the brain areas were grouped into four anatomical categories (Fig. 1): the brain stem and spinal cord (green), the cerebellar structures (orange), the neocortex and striatum (purple) and finally the paleo and archicortices (blue). Fig. 4 shows the ‘Brain PrP^{BSE} Distribution Curve’ (BPDC) of the nine BSE cases and the negative control with the PrP^{BSE} signals plotted using two Y axes, the one on the right represents the WB scale from 0 to 5, and the one on the left, with a logarithmic scale corresponds to the ratio RLU-signal/cut-off. The ratios were used to eliminate variability between different LIA plates.

Interestingly, the overall shape of the BPDC for the WB and the LIA showed a striking similarity. The highest levels of PrP^{BSE} were found in the brain stem and spinal cord whereas the cortical lobes, cerebellar cortex and vermis and the paleo- and archicortices were generally the areas with lower levels of PrP^{BSE}. This is further illustrated by plotting the mean of the nine cases as shown in Fig. 5 indicating that all cases studied here are likely to represent the same strain of BSE.

A comparison of the different cases with regard to the levels of PrP^{BSE} in various anatomical regions illustrates that the progression of the disease can be followed by the sequential accumulation of PrP^{BSE} along the caudal-rostral axis of the brain. PrP^{BSE} is detected with the highest intensity at the level of the brain stem, the areas with lower levels of PrP^{BSE} are the spinal cord, cerebellar structures and archicortex (hippocampus), and finally the regions with the least accumulation of

Table 2
Comparison of WB, IHC and LIA results

	Case 1			Case 3			Case 9			Case 2		
	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU
Ob	3	1	109	0	0	77	3	1	199	1	1	294
Lp	2	1	113	2	0	56	3	1	152	2	0	290
H	4	1	4898	2	1	84	4	1	1570	3	1	1187
Oc	0	0	181	0	0	66	1	1	60	0	0	156
Tc	1	1	72	0	0	47	4	NA	826	0	1	201
Pc	1	0	79	0	NA	42	2	NA	67	1	1	225
Fc	2	0	178	0	0	66	3	NA	112	1	1	209
S	4	1	13581	2	1	63	3	NA	94	3	1	9676
T	4	1	31449	3	1	2024	4	NA	6317	4	1	179737
M	5	1	115424	1	1	69	NA	NA	NA	4	1	240497
P	4	1	3033	3	1	1668	5	NA	79892	5	1	688237
Mob	5	1	325296	4	1	25253	5	1	494737	5	1	466518
Sc	5	1	327523	4	1	11006	5	NA	183106	4	1	185579
Cm	5	1	154279	3	1	6484	3	NA	255	3	1	74602
Cv	5	1	220	3	1	285	3	NA	146	3	1	4887
Cc	3	1	128	2	1	76	3	NA	128	3	1	655

	Case 5			Case 6			Case 4			Case 8			Case 7		
	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU	WB	IHC	RLU
Ob	3	1	717	3	1	1097	0	0	157	0	0	141	1	1	181
Lp	2	1	412	2	1	184	1	1	203	0	0	227	1	1	207
H	3	1	2256	3	1	3054	1	1	152	0	0	167	1	1	267
Oc	2	1	232	1	1	204	0	NA	184	0	0	171	0	0	199
Tc	3	1	256	2	1	243	0	0	157	0	0	191	0	0	312
Pc	3	1	379	0	0	182	0	0	179	0	0	202	2	1	186
Fc	3	1	358	3	1	4880	1	1	223	0	0	213	2	1	395
S	4	1	84982	2	1	252	2	1	247	3	1	393	4	1	500
T	4	1	127209	3	1	18087	3	1	246	2	1	195	5	1	104030
M	5	1	1339196	4	1	940837	4	1	7268	3	1	10841	5	1	37103
P	5	1	954527	4	1	624523	4	1	3446	3	1	3964	3	1	2224
Mob	5	1	998625	5	1	1273046	5	1	88780	3	1	8275	5	1	7090
Sc	4	1	436631	4	1	294989	4	1	4897	3	1	5187	4	1	2268
Cm	4	1	363774	4	1	113234	3	1	2128	1	1	300	3	1	1283
Cv	3	1	2582	3	1	15907	3	1	345	NA	NA	NA	3	1	481
Cc	2	1	437	0	0	460	3	1	210	2	1	285	3	1	523

Results for each brain area (for abbreviations see Fig. 1) of the different BSE cases for WB: Western blotting (“0–5” score for the intensity of the three band pattern), IHC: immunohistochemistry (“1”: positive and “0”: negative) and RLU (LIAs relative light units, Berthold luminometer readings). The cases were distributed in three different LIA plates for which three different cut-off values were calculated. For cases 1, 3 and 9 the cut-off used was 335.625 RLU (original cut-off was 999 RLU), for cases 2, 5, 6, 4 and 8 it was 1043.75 RLU (originally 3017 RLU) and for case 7 was 767.5 RLU (originally 4121 RLU). The cut-off used was calculated as five times the negative control mean, the original cut-off was not used as it yielded false negative results. NA: not analyzed.

PrP^{BSE} are the paleocortex and the neocortex (i.e. those regions that are anatomically far away from the caudal medulla oblongata). Thus, the differences between the cases analyzed in this study could be explained as different phases within the course of the disease. Therefore, the cases can be classified accordingly, from the least affected to the more advanced cases, as follows: case 8 would be the one at the earliest stage of the disease followed by cases 3, 4, 7, 2, 9, 1, 6 and, finally, case 5 as the most affected (Fig. 4).

4. Discussion

The brain stem has been identified as an early site in the central nervous system where deposition of abnormal PrP occurs in BSE (Wells et al., 1989, 1998). Subsequently, the obex has been defined as the target area for monitoring the presence of PrP^{BSE} in classical BSE cases (OIE, 2000). Rapid tests such as LIA and WB were optimized for detecting PrP^{BSE} in the obex and approved for the post-mortem diagnosis of BSE

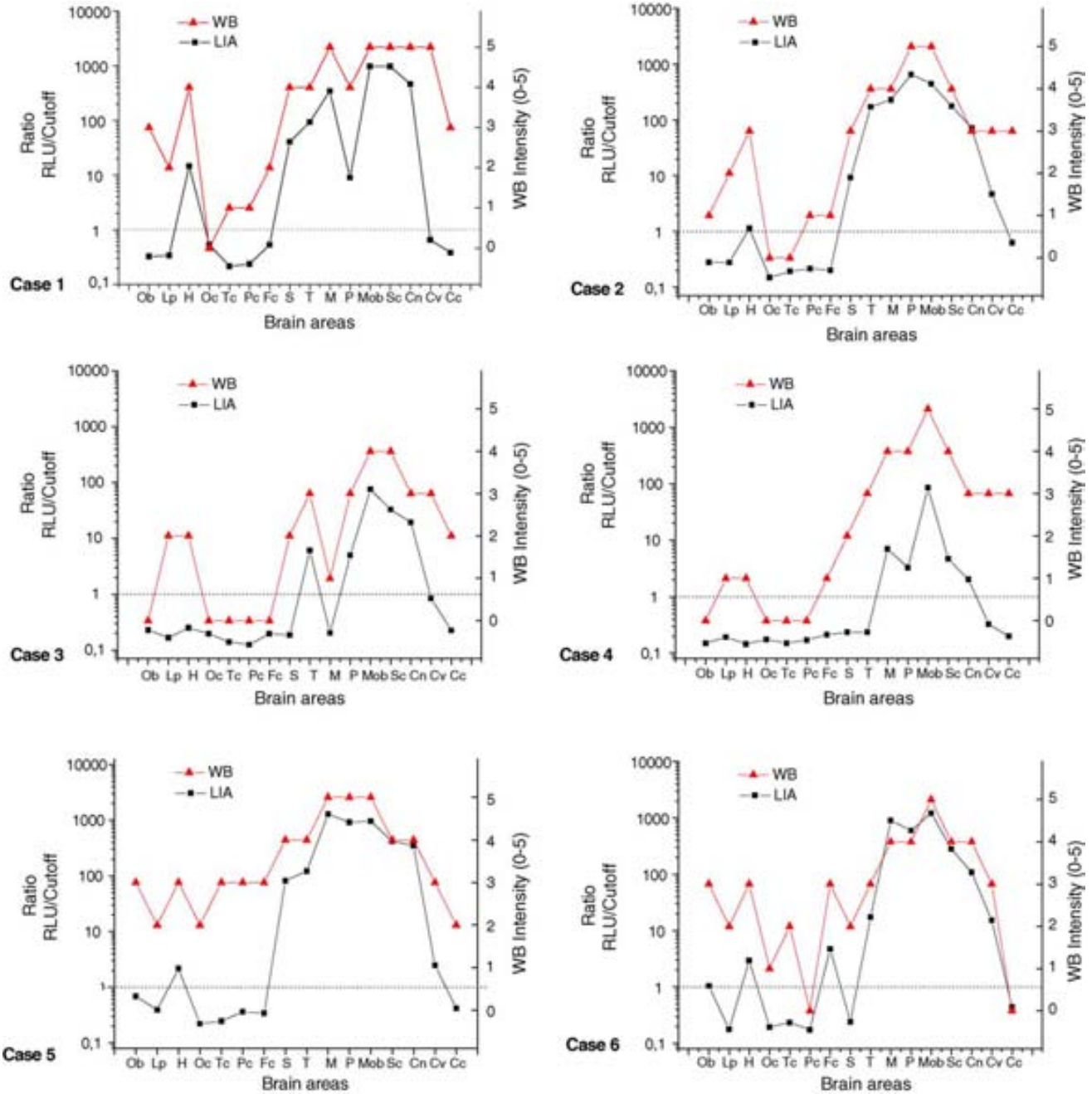


Fig. 4. The PrP^{BSE} distribution curve is plotted for each animal individually, comparing the LIA's RLU/cut-off ratios and the WB subjective interpretation (from 1 to 5 according to the intensity of the bands observed). For brain areas abbreviations see Fig. 1 legend.

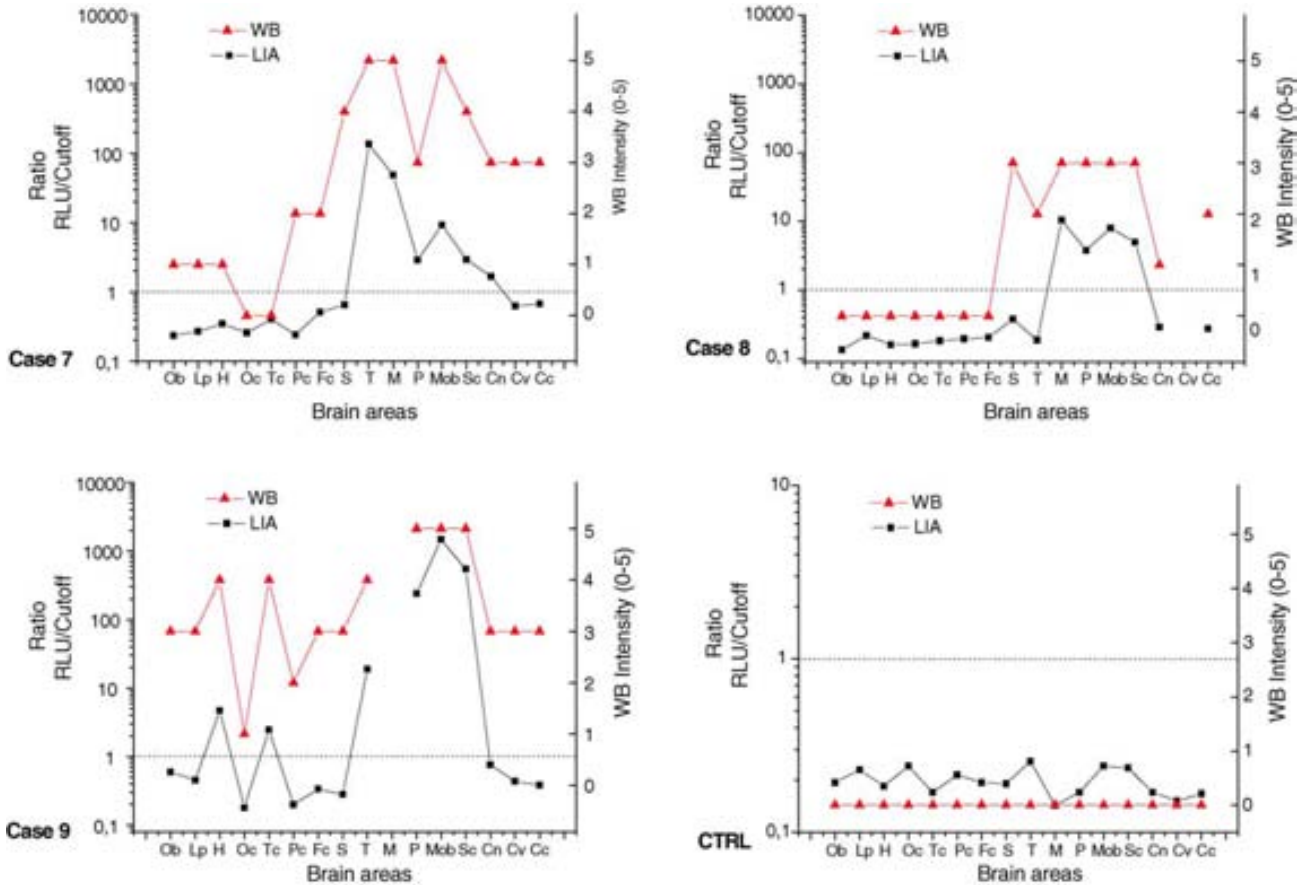


Fig. 4. (Continued).

by the European Commission (Biffiger et al., 2002; Moynagh et al., 1999; Schaller et al., 1999). In the nine BSE cases analyzed in this study not only the obex but also tissue from the spinal cord, pons and mesencephalon showed consistently high levels of PrP^{BSE}.

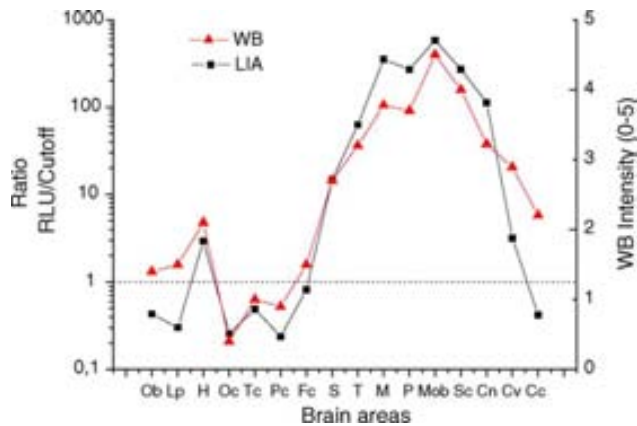


Fig. 5. Comparison of the PrP^{BSE} distribution curve of LIA and WB. The mean of the RLU/cut-off ratio of the nine cases is represented for LIA. Values under 1 are those under the cut-off (i.e. negative to the test). (Cut-off = five times the negative control mean.) For brain area abbreviations see Fig. 1 legend.

In the present study, we have used rapid tests to monitor the levels of PrP^{BSE} in various brain regions that are not routinely sampled for diagnosing BSE. In these brain areas comparisons of biochemical rapid tests with IHC are difficult to interpret because neither the sampling nor the detection of PrP^{BSE} has been optimized. Several factors have been described that could affect the analysis of PrP in brain tissue using biochemical methods (Notari et al., 2004). These factors include the total protein content versus the lipid content, the pH of the homogenate, the metal ion concentration and possibly, yet undefined, brain area dependent biochemical properties of PrP^{BSE}. These factors could interfere with the proteolytic digestion and immunological reactivity of PrP. Studies on the glycotype pattern of PrP^{CJD} in the brains of Creutzfeldt–Jakob disease patients have shown that brain area dependent factors influence the properties of PrP with regard to protease digestion (Parchi et al., 2000).

In this paper, we present a method for rapidly evaluating the distribution of PrP^{BSE} in different brain areas of BSE-affected cattle and propose that this method could be used for further characterization of the strain causing TSE cases in cattle.

In addition, the BPDC is a tool to assess the stage of the disease in BSE-affected cattle because it allows the spread of the BSE agent to be followed using PrP^{BSE} as a marker for

the infectious agent. It has been shown that the TSE agents enter the nervous system at the site of the medulla oblongata and then spread to different anatomical regions of the brain (Beekes et al., 1998; Van Keulen et al., 2002). This mode of PrP^{BSE} distribution, demonstrated in hamsters and sheep, corresponds well with our findings: PrP^{BSE} deposits are more abundant in the brainstem and the hippocampus compared to lower levels of PrP^{BSE} in the paleocortex and neocortex, suggesting that these areas are invaded by the BSE agent at a later time point in the disease than the former.

Even though both rapid tests obtain similar-shaped BPDC, each technique has its own different advantages. The LIA test gives objective numerical results, which allow differences in the studied anatomical areas with high levels of PrP^{BSE} to be discriminated. In contrast, the WB has shown a higher sensitivity in detecting low levels of PrP^{BSE} in areas other than the cranial spinal cord, medulla oblongata, pons and mesencephalon. Moreover the WB provides additional information on the biochemical properties of PrP^{BSE} (i.e. molecular weight and glycoprofile).

Observing the BPDC for all the cases studied we can conclude that all cases fall into a similar PrP^{BSE} distribution pattern, but with differences in intensity corresponding to different stages of the disease. This is important information given by the BPDC, which would allow us to readily discriminate between the typical cases of BSE and the recently described atypical cases (Casalone et al., 2004; Crescio et al., 2004), which feature a markedly different PrP distribution within the brain. In those cases PrP^{BSE} is abundant in the olfactory bulbs and hippocampus but lower levels are described in the medulla oblongata, this would be detected as a shift to more dorso-rostral areas of the BPDC or the appearance of a peak at the region of the olfactory bulb and other rostral structures such as the piriform lobe or the frontal cortex. If the current sampling methods are to be used (i.e. a rapid test only performed on the obex) potential atypical cases with lower PrP^{BSE} levels in the obex than those described by Casalone et al. (2004) might go undiagnosed.

The BPDC is, however, a complementary technique to immunohistochemical mapping of PrP^{BSE} deposition, since the latter gives us accurate information on the neuroanatomical and subcellular distribution of PrP^{BSE} deposits. Still the time devoted to obtaining and interpreting the BPDC is much shorter than that needed to read the IHC of a whole bovine brain.

Repeatability of these results still needs to be assessed with larger numbers of animals, and correlated to other data such as neurological signs, incubation periods and other parameters related to the pathogenesis of the disease.

Experimental studies with animals of a known incubation period, dose of infection and thorough neurological examination should be performed in order to corroborate and strengthen the usefulness of the BPDC (either LIA or WB) in predicting the pathological stage of a case and determining the strain of the infectious agent as classical or atypical BSE.

Acknowledgements

We would like to thank:

- Prionics AG distributors in Spain: Cultek, S.L., particularly Antonio Lozano and Javier Albadalejo for making this study possible.
- Ivan Córdón, M^a Sierra Espinar and Anna M^a Llorens for technical assistance.
- Anna Alba (CRESA), Jose Miguel Vela (Esteve Labs.), Raül Tortosa and Carme Costa (Animal Medicine and Surgery Department, UAB Veterinary Faculty), Anna Basols and Montse Serra (Biochemistry Department, UAB, Veterinary Faculty).
- The financial support of the Departament de Sanitat i Seguretat Social (DSSS) and Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca (DARP) of the Generalitat de Catalunya.

References

- Badiola, J.J., Monleon, E., Monzon, M., Acin, C., Lujan, L., Fernandez, D., Simmons, M., Vargas, A., 2002. Description of the first cases of BSE in Spain. *Vet. Rec.* 151 (17), 509–510.
- 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.
- Biffiger, K., Zwald, D., Kaufmann, L., Briner, A., Nayki, I., Purro, M., Bottcher, S., Struckmeyer, T., Schaller, O., Meyer, R., Fatzner, R., Zurbriggen, A., Stack, M., Moser, M., Oesch, B., Kubler, E., 2002. Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate. *J. Virol. Meth.* 101 (1/2), 79–84.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCardle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C.J., 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389 (6650), 498–501.
- Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, F., Monaco, S. and Caramelli, M., 2004. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: molecular similarities with sporadic Creutzfeldt–Jakob disease. *PNAS*, 0305777101.
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F., 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383 (6602), 685–690.
- Cooley, W.A., Clark, J.K., Ryder, S.J., Davis, L.A., Farrelly, S.S., Stack, M.J., 2001. Evaluation of a rapid western immunoblotting procedure for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE) in the UK. *J. Comp. Pathol.* 125 (1), 64–70.
- Crescio, M.I., Acutis, P., Maurella, C., Mazza, M., Ingravalle, F., Ru, G., Gazzuola, P., Capucci, L., Zanusso, G., Caramelli, M., Casalone, C., 2004. Searching for BASE: an ongoing study. In: Proceedings of the First International Conference of the European Network of Excellence NeuroPrion, p. 100.
- Dillner, L., 1996. BSE linked to new variant of CJD in humans. *BMJ* 312 (7034), 795.
- 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 (5), 1339–1350.
- 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. (Berl)* 87 (1), 86–90.

- Ironside, J.W., Sutherland, K., Bell, J.E., McCardle, L., Barrie, C., Estebeiro, K., Zeidler, M., Will, R.G., 1996. A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease: neuropathological and clinical features. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 61, 523–530.
- Jeffrey, M., Martin, S., Gonzalez, L., 2003. Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 4), 1033–1045.
- Morignat, E., Ducrot, C., Roy, P., Baron, T., Vinard, J.L., Biacabe, A.G., Madec, J.Y., Bencsik, A., Debeer, S., Eliazewicz, M., Calavas, D., 2002. Targeted surveillance to assess the prevalence of BSE in high-risk populations in western France and the associated risk factors. *Vet. Rec.* 151 (3), 73–77.
- Moynagh, J., Schimmel, H., Kramer, G.N., 1999. European Commission. The evaluation of tests for the diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in bovines. 08-08-1999.
- Notari, S., Capellari, S., Giese, A., Westner, I., Baruzzi, A., Ghetti, B., Gambetti, P., Kretzschmar, H.A., Parchi, P., 2004. Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J. Biol. Chem.* 279 (16), 16797–16804.
- OIE, (2000). 2.3.13 Bovine Spongiform Encephalopathy, Manual of standards Diagnostic tests and Vaccines 2000, 4th ed., Office International des Epizooties.
- Parchi, P., Capellari, S., Gambetti, P., 2000. Intracerebral distribution of the abnormal isoform of the prion protein in sporadic Creutzfeldt–Jakob disease and fatal insomnia. *Microsc. Res. Tech.* 50 (1), 16–25.
- Prusiner, S.B., 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 216 (4542), 136–144.
- Regulation (EC), C., 2003. No. 1053/2003 of 19 June, 2003 amending Regulation (EC) No. 999/2001 of the European Parliament and of the Council as regards rapid tests (Text with EEA relevance). *Official J. Eur. Union L* 152, pp. 8–9.
- Schaller, O., Fatzer, R., Stack, M., Clark, J., Cooley, W., Biffiger, K., Egli, S., Doherr, M., Vandeveld, M., Heim, D., Oesch, B., Moser, M., 1999. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol. (Berl)* 98 (5), 437–443.
- Schimmel, H., Catalani, P., Le Guern, L., Prokicsh, J., Phillip, W., Trapmann, S., Zeleny, R., Moynagh, J., 2002. European commission directorate-general JRC Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) RM Unit. The Evaluation Of Five Rapid Tests For The Diagnosis Of Transmissible Spongiform Encephalopathy In Bovines (2nd study). 27 March, 2002.
- Sisó, S., Ordoñez, M., Cerdón, I., Vidal, E., Pumarola, M., 2004. Distribution of PrPres in the brains of BSE-affected cows detected by active surveillance in Catalonia, Spain. *Vet. Rec.* 155, 524–525.
- Sisó, S., Puig, B., Varea, R., Vidal, E., Acin, C., Prinz, M., Montrasio, F., Badiola, J., Aguzzi, A., Pumarola, M., Ferrer, I., 2002. Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie. *Acta Neuropathol. (Berl)* 103 (6), 615–626.
- 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.
- 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., Chaplin, M.J., Stack, M.J., Dawson, M., 1998. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet. Rec.* 142 (5), 103–106.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R., 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121 (18), 419–420.
- Will, R.G., Ironside, J.W., Zeidler, M., Cousens, S.N., Estibeiro, K., Alperovitch, A., Poser, S., Pocchiarri, M., Hofman, A., Smith, P.G., 1996. A new variant of Creutzfeldt–Jakob disease in the UK. *Lancet* 347 (9006), 921–925.

Treball núm. 2

Molecular profiling and comparison of field transmissible spongiform encephalopathy cases diagnosed in Catalunya.

Vidal E, Márquez M, Costa C, Tortosa R, Domènech A, Serafín A, Pumarola M.

2006 Acceptat a *The Veterinary Journal*.

Available online at www.sciencedirect.com

ELSEVIER

SCIENCE @ DIRECT®

The Veterinary Journal xxx (2006) xxx–xxx

The
Veterinary Journalwww.elsevier.com/locate/tvj

Short communication

Molecular profiling and comparison of field transmissible spongiform encephalopathy cases diagnosed in Catalunya

E. Vidal ^a, M. Márquez ^{b,c}, C. Costa ^c, R. Tortosa ^c, A. Domènech ^c,
A. Serafín ^c, M. Pumarola ^{a,b,c,*}

^a *Laboratori PRIOCAT, Centre de Recerca en Sanitat Animal, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain*

^b *Animal Tissue Bank of Catalunya (BTAC), Institut de Neurociències, UAB, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain*

^c *Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, UAB, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain*

12 Abstract

13 Molecular profiling of the proteinase K resistant prion protein (PrP^{Res}) is a technique that has been applied to the characterisation of
14 transmissible spongiform encephalopathy (TSE) strains. An interesting example of the application of this technique is the ability to dif-
15 ferentiate, at the experimental level, between bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie infection in sheep, and to distinguish
16 between classical and atypical BSE and scrapie cases. Twenty six BSE cases and two scrapie cases from an active TSE surveillance pro-
17 gram and diagnosed at the PRIOCAT Reference TSE Laboratory (Centre de Recerca en Sanitat Animal, Universitat Autònoma de Bar-
18 celona, Catalunya, Spain) were examined by Western blotting. Molecular profiling was achieved by comparing the glycosylation profile,
19 deglycosylated PrP molecular weight and 6H4/P4 monoclonal antibody binding ratio. The results obtained during the characterisation of
20 these field cases indicated an absence of atypical BSE cases in Catalunya.

21 © 2006 Published by Elsevier Ltd.

22 **Keywords:** Molecular profile; BSE; Scrapie; Prion protein

24 Until recently, techniques based on mice bioassay (Fra-
25 ser and Dickinson, 1968) have been the only tools available
26 for transmissible spongiform encephalopathy (TSE) strain
27 differentiation. However, molecular profiling of the pro-
28 teinase K resistant prion protein (PrP^{Res}) is a technique,
29 which has been lately applied to the characterisation of
30 strains and has been used to differentiate between bovine
31 spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie infection
32 in sheep (Stack et al., 2002; Thuring et al., 2004) or atypical
33 BSE cases as described in France (Biacabe et al., 2004) and
34 Italy (Casalone et al., 2004). Mice lesion profiling studies
35 are, however, still required to confirm a diagnosis of a spe-
36 cific strain infection in a field case, and involve inoculating

mice strains with a certain TSE isolate. Parameters such as
the incubation period and the quantification of vacuoles in
several brain sites yield a profile that is characteristic for
each prion strain (usually several passages from mouse to
mouse are required to stabilise one strains profile) (Fraser
and Dickinson, 1968).

Here we present molecular profiling studies of TSE cases
diagnosed in the active surveillance program in the PRIO-
CAT, TSE Reference laboratory in Catalunya, Spain. The
work was undertaken with a view to ruling out the exis-
tence of atypical TSE cases in the region. To this end,
molecular profiling, including glycosylation pattern, degly-
cosylated PrP^{Res} molecular weight and monoclonal anti-
body (mAb) 6H4/P4 immunolabelling was carried out on
26 BSE cases and the only two scrapie cases diagnosed in
Catalunya. Although there have been 45 BSE cases diag-
nosed in the region, we selected 26 samples (57%) based
both on post mortem delay and the amount of sample

* Corresponding author. Address: Department of Animal Medicine and Surgery, Veterinary Faculty, UAB, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain. Tel.: +34 935 81 14 33; fax: +34 935 81 31 42.
E-mail address: marti.pumarola@uab.es (M. Pumarola).

55 available. Samples which were autopsied beyond 48 h were
56 discarded (these were usually samples from fallen stock,
57 and heavily autolysed). All other animals were humanely
58 killed in slaughterhouses.

59 In both scrapie cases, the genotype for the Prnp gene
60 (encoding for the host prion protein) was homozygous
61 for the ARQ gene. Sheep carrying this genotype are suscep-
62 tible to the scrapie agent (Atkinson, 2001).

63 Proteinase K (PK) digestion and Western blotting (WB)
64 were performed following the manufacturers' instructions
65 (Prionics-Check WB Kit). For antibody binding compari-
66 son, the original antibody supplied (6H4 mAb 1:5000)
67 was substituted for the P4 mAb (1:2500, kindly provided
68 by B. Oesch). PrP^{res} deglycosylation was performed using
69 PNGase F following the manufacturers' instructions (New
70 England Biolabs). Glycosyl digestion was carried out by
71 incubating proteinase K-treated denatured homogenates
72 with 0.5 PNGase F U/ μ L for 1 h at 37 °C. A Bio-Rad Multi
73 Analyst TM V1.1 was used to determine glycoform propor-
74 tions and the molecular weight of the deglycosylated PrP^{res}
75 blots by densitometry of the immunolabelled Western blot
76 membranes. For each sample an average of eight runs were
77 evaluated (ranging from a minimum of 3 to a maximum of
78 19). Origin 7.0 software was used for data analysis.

79 All BSE and scrapie samples presented the characteristic
80 three banded pattern corresponding to diglycosylated (top
81 band), monoglycosylated (middle band) and unglycosy-
82 lated (bottom band) forms of the prion protein. The 26
83 BSE cases included in this study presented a similar glyco-
84 sylation profile, which differed from that of the two studied
85 scrapie cases (Fig. 1).

86 In cases of both BSE and scrapie, the diglycosylated
87 form was the most abundant glycoform, although in the
88 BSE cases this was almost 12% more abundant than in

Table 1

PrP^{res} molecular weight (kDa) and proportion (%) of the PrP^{res} glycoforms of BSE and scrapie cases

PrP ^{res} TSE	MW (kDa)	H (%)	L (%)	U (%)
Scrapie	22.0 \pm 0.1	51.7 \pm 3.3	34.1 \pm 0.0	10.4 \pm 2.3
BSE	20.0 \pm 0.7	63.5 \pm 4.1	25.9 \pm 2.6	10.4 \pm 2.3

Scrapie cases showed a higher proportion of the L glycoform and a lower proportion of the H glycoform when compared to BSE cases. The U band proportion is indistinguishable from both PrP^{res} forms. Glycoforms are represented as: (U) unglycosylated, (L) monoglycosylated and (H) diglycosylated forms. When compared within the same gel, a consistent 2 kDa difference was observed between scrapie and BSE unglycosylated moiety. Mean values \pm standard deviations are shown.

the scrapie cases (Table 1). This difference reflected the
finding that a major proportion of the monoglycosylated
form was found in the scrapie cases as the proportion of
both unglycosylated bands was similar. The glycoform pat-
tern found in our BSE and scrapie cases fell within the
range of data published by other authors (Baron et al.,
2004, 1999; Gretzschel et al., 2005; Nonno et al., 2003;
Stack et al., 2002). Glycosylation pattern analysis allowed
us not only to discriminate between BSE and scrapie cases
but also to confirm the absence in these samples of atypical
BSE (Biacabe et al., 2004) or scrapie (Benestad et al., 2003).

In the regular blots used to determine the glycoform
ratios, a difference in the molecular weight of the unglyco-
sylated band between BSE and scrapie cases was identified.
To analyse this difference better, PrP deglycosylation was
performed before Western blotting (Fig. 2). Deglycosyla-
tion of the resistant prion protein increased the unglycosy-
lated band signal. The measurement of the molecular
weight of the deglycosylated band showed a 2 kDa higher
mean value for the scrapie prion protein (22.0 \pm 0.1 kDa)
when compared to the BSE prion protein (20.0 \pm 0.7
kDa) (Fig. 2). Differences in the thickness of the bands
due to different PrP^{res} load were minimized by diluting
these samples to achieve a similar PrP^{res} concentration.
In some cases, a double band could be seen (see, for exam-
ple, Fig. 2B18), increasing the molecular weight variation
among the samples. This phenomenon was deemed to have
occurred as a consequence of the different proteinase K N-
terminal truncation sites of the BSE PrP^{res} glycosylated
and unglycosylated glycoforms (Nonno et al., 2003).
Accordingly, the resulting band after deglycosylation
would be composed of fragments with slight differences
in molecular weight depending on the parent glycoform.

In previous studies, similar differences in MW between
scrapie and BSE cases have been found (Gretzschel et al.,
2005; Nonno et al., 2003; Stack et al., 2002). The slightly
higher MW of the scrapie cases PrP^{res} is explained by a
conformational underexposure of the PK cleavage regions
associated to the scrapie agent (Thuring et al., 2004)
(Fig. 3).

P4 mAb immunolabelling has been used to distinguish
between scrapie and BSE PrP^{res} by Western blotting (Stack
et al., 2002; Thuring et al., 2004; Gretzschel et al., 2005),
since this antibody immunolabels PrP^{res} from scrapie but

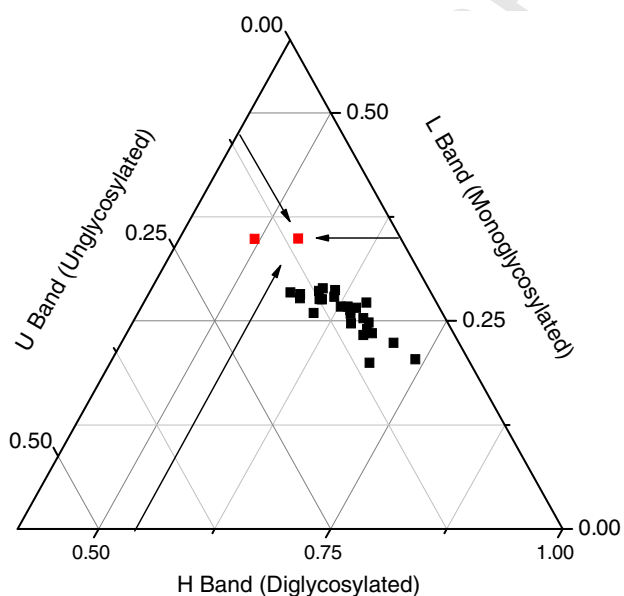


Fig. 1. Triangular plot for the individual glycoform proportions of BSE (black) and scrapie (grey) cases. Note the different location of the scrapie cases from the BSE ones.

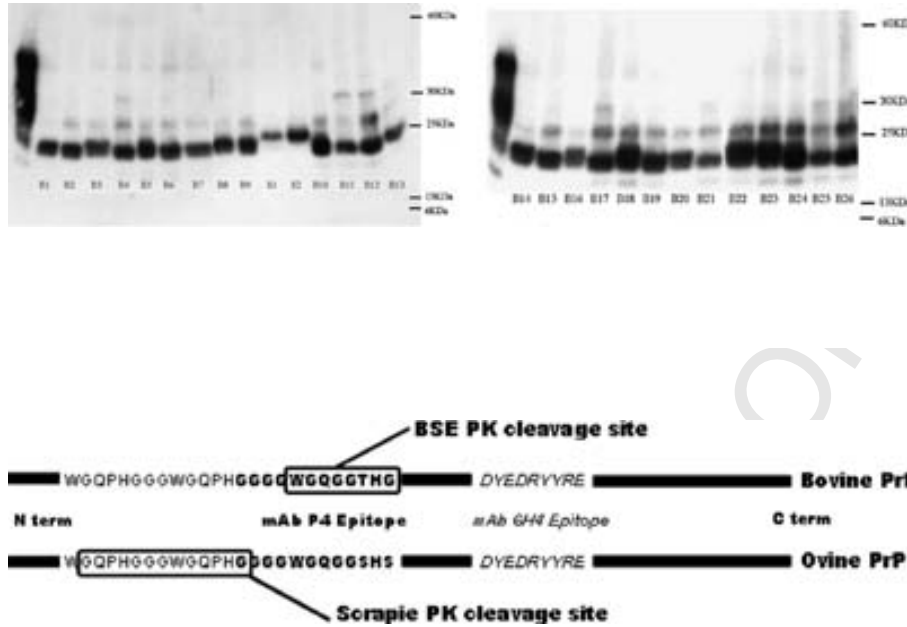


Fig. 3. Scheme of the amino acid sequence for ovine and bovine PrP^{res}. The epitope of mAb 6H4 is shown in italics and that of mAb P4 in bold font. The boxes indicate the proposed cleavage sites of PK for PrP^{res} from BSE and the scrapie agent (Thuring et al., 2004). Note that the P4 mAb epitope is located inside the cleavage site of the PK in the PrP^{BSE}.

133 not from BSE due to the absence of the mAb-P4 epitope in
134 the PK digested PrP^{res} from BSE (Fig. 3). MAb 6H4 is able
135 to immunolabel both prion proteins because its epitope is
136 located upstream of the proteinase K cleavage site. In the
137 present study, parallel blotting and immunolabelling of
138 the TSE samples with mAbs 6H4 and P4 demonstrated
139 that scrapie-PrP^{res} was heavily labelled by both mAbs
140 whereas BSE PrP^{res} was strongly labelled by 6H4 and, only
141 in some cases, mildly labelled by P4 as a consequence of
142 partial proteinase K digestion of the cellular prion protein
143 (see the arrows in Fig. 4).

The glycosylation profile, molecular weight and P4/6H4
immunolabelling found in these BSE and scrapie cases
were comparable to those described previously (Baron
et al., 1999; Gretzschel et al., 2005; Nonno et al., 2003;
Stack et al., 2002; Thuring et al., 2004). We believe that
these results, together with other studies performed in
our laboratory including histopathology, immunohisto-
chemistry and brain PrP^{res} distribution (Vidal et al.,
2005), permit us to discard any atypical BSE or scrapie
case. We are now performing these examinations for all
new cases presented to the laboratory.

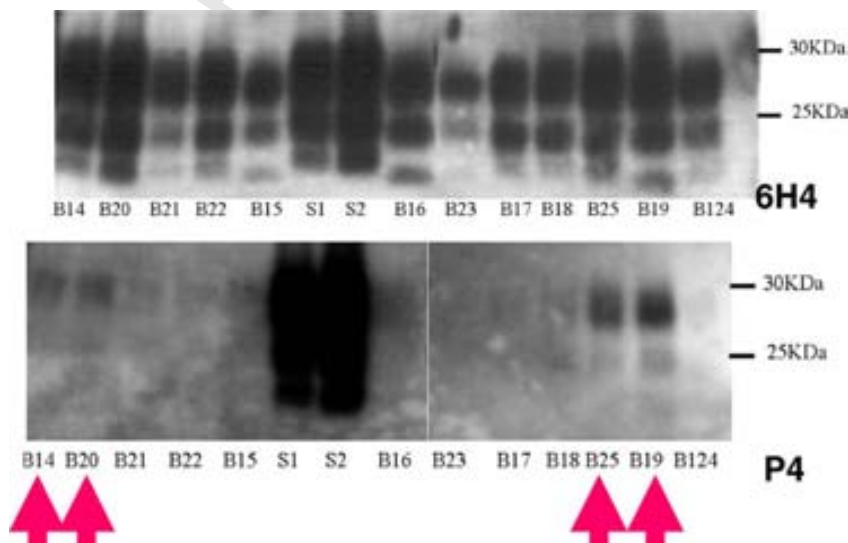


Fig. 4. Parallel immunoblots labelled with mAb 6H4 and P4 of some BSE and scrapie cases. Note the absence of P4 labelling of PrP^{res} in BSE samples. Arrows show incomplete PK digested bovine prion protein.

155 Although we have validated the suitability of the molec-
 156 ular profiling technique in our TSE regional reference diag-
 157 nostic laboratory (RRDL), we believe that such studies
 158 should be routinely carried out in all TSE RRDLs to
 159 increase knowledge of TSE strain variation and allow a
 160 more rapid detection of atypical cases. The technique offers
 161 a good first sieve to discriminate strains and can be sup-
 162 ported by more robust tests (such as the mouse bioassay)
 163 that thoroughly discriminate between strains but are far
 164 more expensive and time consuming than molecular profil-
 165 ing, and do not fit easily within a TSE RRDL routine. Sim-
 166 ilar studies carried out by other authors (Baron et al. 2000;
 167 Stack et al., 2002; Nonno et al., 2003; Thuring et al., 2004)
 168 have indicated the practicality of these techniques in dis-
 169 criminating between classical scrapie and BSE in sheep.

170 Acknowledgements

171 This work has been done, thanks to the support of the
 172 Departament de Sanitat i Seguretat Social (DSSS) and
 173 Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca (DARP)
 174 of the Catalan Government. We wish to thank the excellent
 175 technical assistance of Sierra Espinar, Marta Valle, Iván
 176 Cerdón and Anna M^a Llorens. The study was partially
 177 funded by the Research Project, Ref. EET2002-05168-
 178 C04-01, of the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

179 References

180 Atkinson, M., 2001. National scrapie plan. *Veterinary Record* 149, 462.
 181 Baron, T.G., Madec, J.Y., Calavas, D., 1999. Similar signature of the
 182 prion protein in natural sheep scrapie and bovine spongiform
 183 encephalopathy-linked diseases. *Journal of Clinical Microbiology* 37,
 184 3701–3704.
 185 Baron, T., Crozet, C., Biacabe, A.G., Philippe, S., Verchere, J., Bencsik,
 186 A., Madec, J.Y., Calavas, D., Samarut, J., 2004. Molecular analysis of
 187 the protease-resistant prion protein in scrapie and bovine spongiform

encephalopathy transmitted to ovine transgenic and wild-type mice. *Journal of Virology* 78, 6243–6251. 188
 189
 Benestad, S.L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M.A., 190
 Bratberg, B., 2003. Cases of scrapie with unusual features in Norway 191
 and designation of a new type, Nor98. *Veterinary Record* 153, 202– 192
 208. 193
 Biacabe, A.G., Laplanche, J.L., Ryder, S., Baron, T., 2004. Distinct 194
 molecular phenotypes in bovine prion diseases. *European Molecular 195*
Biology Organisation Reports 5, 110–115. 196
 Casalone, C., Zanusso, G., Acutis, P., Ferrari, S., Capucci, L., Tagliavini, 197
 F., Monaco, S., Caramelli, M., 2004. Identification of a second bovine 198
 amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with 199
 sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Proceedings of the National 200*
Academy of Science 101, 3065–3070. 201
 Fraser, H., Dickinson, A.G., 1968. The sequential development of the 202
 brain lesion of scrapie in three strains of mice. *Journal of Comparative 203*
Pathology 78, 301–311. 204
 Gretzschel, A., Buschmann, A., Eiden, M., Ziegler, U., Luhken, G., 205
 Erhardt, G., Groschup, M.H., 2005. Strain typing of German 206
 transmissible spongiform encephalopathies field cases in small rumi- 207
 nants by biochemical methods. *Journal of Veterinary Medicine B 208*
Infectious Diseases and Veterinary Public Health 52, 55–63. 209
 Nonno, R., Esposito, E., Vaccari, G., Conte, M., Marcon, S., Di Bari, M., 210
 Ligios, C., Di Guardo, G., Agrimi, U., 2003. Molecular analysis of 211
 cases of Italian sheep scrapie and comparison with cases of bovine 212
 spongiform encephalopathy (BSE) and experimental BSE in sheep. 213
Journal of Clinical Microbiology 41, 4127–4133. 214
 Stack, M.J., Chaplin, M.J., Clark, J., 2002. Differentiation of prion 215
 protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep- 216
 passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform 217
 encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep 218
 experimentally inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. 219
Acta Neuropathologica (Berlin) 104, 279–286. 220
 Thuring, C.M.A., Erkens, J.H.F., Jacobs, J.G., Bossers, A., Van Keulen, 221
 L.J.M., Garssen, G.J., Van Zijderveld, F.G., Ryder, S.J., Groschup, 222
 M.H., Sweeney, T., Langeveld, J.P.M., 2004. Discrimination between 223
 scrapie and bovine spongiform encephalopathy in sheep by molecular 224
 size, immunoreactivity, and glycoprofile of prion protein. *Journal of 225*
Clinical Microbiology 42, 972–980. 226
 Vidal, E., Marquez, M., Ordonez, M., Raeber, A.J., Struckmeyer, T., 227
 Oesch, B., Siso, S., Pumarola, M., 2005. Comparative study of the 228
 PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests. 229
Journal of Virological Methods 127, 24–32. 230
 231

Treball núm. 3

Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages.

Vidal E, Márquez M, Tortosa R, Costa C, Serafín A, Pumarola M.

2006 *Journal of Virological Methods*. 134:15-29

Immunohistochemical approach to the pathogenesis of bovine spongiform encephalopathy in its early stages

E. Vidal^a, M. Márquez^{b,c}, R. Tortosa^b, C. Costa^b, A. Serafín^b, M. Pumarola^{a,b,c,*}

^a Priocat Laboratory, CReSA, Veterinary Faculty, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain

^b Animal Medicine and Surgery Department-Neuroscience Institute, Veterinary Faculty, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain

^c Animal Tissue Bank of Catalonia (BTAC), Veterinary Faculty, Autonomous University of Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), Barcelona, Spain

Received 15 July 2005; received in revised form 11 November 2005; accepted 15 November 2005

Available online 9 January 2006

Abstract

An immunohistochemical and histochemical study was carried out on the brains of nine cases of BSE-diagnosed cattle as part of the surveillance plan in Catalonia, Spain. The animals had no clinical symptoms reported and were thus at early stages of the disease.

The first part of the study consisted of a characterization of PrP^{BSE} deposits throughout the encephalon. The behaviour of the different immunolabelling patterns was analysed and tropism of some patterns towards certain brain areas was described. This tropism is principally directed to the brain stem region; however, an association of the stellate pattern was found with areas where PrP^{BSE} is deposited less abundantly, such as the cerebral cortex.

Secondly, distinct pathogenesis mechanisms that take place in the early stages of BSE, which would include these cases were investigated. This study describes the glial response to the presence of PrP^{BSE} (using antibodies against astrocytic glial fibrillary acidic protein and lectin from *Griffonia simplicifolia* to identify microglia), the presence of mild oxidative stress phenomena (antibodies against metallothioneins I and II and against nitrated aminoacidic residues: nitrotyrosine), the apparent absence of apoptotic cellular death (cleaved caspase 3) and the preservation of synaptic proteins synaptophysin and small synaptosome-associated 25 kDa protein immuno-labelling. Finally, no alteration of the extra-cellular matrix was detected with the use of *Wisteria floribunda* agglutinin, a marker for perineuronal nets.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Bovine spongiform encephalopathy; Prion protein; Pathogenesis; Glia

1. Introduction

Transmissible spongiform encephalopathies (TSEs or prion diseases) are a group of fatal human and animal neurodegenerative diseases which can also be present in sporadic or inherited forms. Included in this group are bovine spongiform encephalopathy (BSE) and scrapie. Scrapie affects sheep and goat species (Hadlow and Eklund, 1968) and the disease has suggested as the possible origin of BSE in cattle (Wilesmith et al., 1988). TSEs are also present in a variety of other species, including chronic wasting disease (CWD) which affects wild ruminants such as elk and mule deer,

feline spongiform encephalopathy (FSE) which affects domestic cats and zoo-kept wild felines, and transmissible mink encephalopathy (TME) among others (Barlow, 1972; Pearson et al., 1991; Williams and Young, 1980). Human TSE forms include Creutzfeldt–Jakob disease (CJD), fatal familial insomnia (FFI), Kuru, and Gerstmann–Straussler–Scheinker disease (GSS) (Creutzfeldt, 1989; Gajdusek and Zigas, 1957; Gertsmann, 1928; Jakob, 1989; Lugaresi et al., 1986).

All these forms of TSEs have a distinctive feature in common, which is the accumulation of an abnormal protease resistant conformer of the host encoded prion protein (PrP): the scrapie-associated PrP (PrP^{Sc}), also termed PrP^{res} or PrP^{BSE} for BSE cases. It has been postulated that the prion protein is the infective agent responsible for TSE transmission (Bolton et al., 1982). Furthermore, Dr. Prusiner's group has recently demonstrated disease transmission in a transgenic mouse model merely using

* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1433; fax: +34 93 581 3142.
E-mail address: marti.pumarola@uab.es (M. Pumarola).

a recombinant prion protein infective agent (Legname et al., 2004).

After the first diagnosis of BSE in cattle in 1986 (Wells et al., 1987), this animal disease was associated with a new variant of the CJD (nvCJD) that affects human beings at a much younger age than classical CJD. Furthermore, it is believed to be principally a food-borne disease. Several pieces of evidence support the idea that BSE and nvCJD are caused by the same agent (Bruce et al., 1997; Collinge et al., 1996). Further understanding of the PrP^{BSE} neuro-invasion and neuro-degeneration mechanisms in cattle would be useful in understanding the pathogenesis of human nvCJD.

Following the diagnosis of the first case of BSE in Spain (Badiola et al., 2002), a surveillance plan was also implemented in Catalonia. Priocat Laboratory acts as a reference laboratory confirming the cases diagnosed in Catalonia, Spain. Samples coming from most of these field cases, including whole brain, have been made available and have been included in the archive of the Animal Tissue Bank of Catalonia (BTAC) (<http://antalya.uab.es/btac>).

Previous studies performed in this laboratory on these field cases, consisting of biochemical approaches for detecting PrP^{BSE}, revealed differences in the topography of PrP deposition throughout the several areas of the brain. However, these differences have been attributed to different time points of the disease, all caused by the same strain of BSE (Siso et al., 2004; Vidal et al., 2005).

The aim of this study was to investigate further the particular features of PrP^{BSE} deposition, which was seen previously as being area-dependent (Siso et al., 2004). For this purpose a lesion profile and a PrP^{BSE} immuno-labelling pattern distribution study was performed on the whole brains of nine selected BSE field cases in order to estimate the time point of the disease in each case. Considering the relatively small sample size, this is an exploratory study and the results have to be interpreted taking this fact into account.

The second objective of this study was to clarify, using immunohistochemistry and affinity histochemistry techniques, some of the pathogenetic events taking place during the progression of the disease. For this purpose several aspects were studied, such as neuro-inflammation, metallothionein expression, apoptosis (C3A), synapsis (synaptophysin and SNAP 25) and extra-cellular matrix status (*Wisteria floribunda* agglutinin, WFA).

2. Materials and methods

2.1. Samples and general procedures

For the present study nine cattle brains diagnosed with BSE and five healthy control specimens were used. These brains, obtained from the active TSE surveillance program in Catalonia, were positive for PrP^{BSE} in the screening test (Prionics-Check Western Blotting, WB) and confirmed as such by histopathology and immunohistochemistry.

None of the cases studied, according to official veterinary reports, showed any detectable clinical sign at the ante-mortem

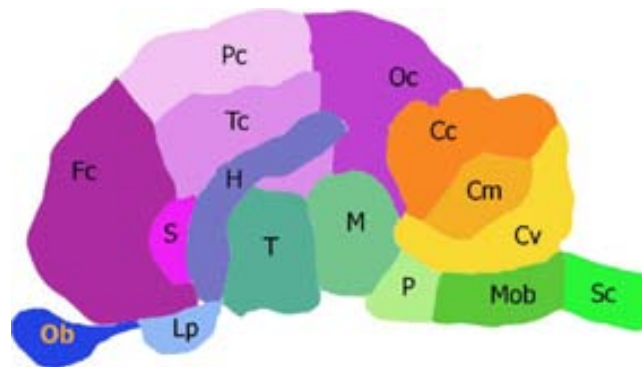


Fig. 1. Schematic representation of the 16 main brain areas included in this study. Ob (olfactory bulbs and rostral olfactory peduncles), Lp (piriform lobe), H (hippocampus), Fc (frontal cortex), Tc (temporal cortex), Pc (parietal cortex), Oc (occipital cortex), S (striatum, includes caudate and lenticular nuclei), T (thalamus), M (mesencephalon), P (pons), Mob (medulla oblongata), Sc (cervical spinal cord), Cv (cerebellar vermis), Cm (cerebellar medulla), Cc (cerebellar hemispheres).

inspection, except for case 9, which presented hind limb dislocation and was slaughtered immediately. Follow-up of the BSE focus after diagnosis in each case, carried out by the Catalan Agriculture Department, reported no additional relevant clinical signs.

All the animals were female cattle belonging to the Friesian breed and their ages ranged from 4 to 8 years; see Table 1 for details. Post-mortem delay was approximately 24–48 h at 4 °C. The whole brain was sampled, along with various tissues such as hypophysis, trigeminal ganglia, eyeball and optic nerve, salivary gland, olfactory mucosa, tongue, masseter muscle, retropharyngeal lymph node, tonsil and oesophagus.

The brain was sectioned sagittally into halves; one half was dissected into 16 brain areas as shown schematically in Fig. 1 and was kept frozen at minus 74 °C for biochemical studies. The other half was immersed in 10% phosphate-buffered formalin for 15 days. After fixation, 4 mm thick tissue sections were blocked and immersed in 98% formic acid for 1 h to reduce prion infectivity before being embedded in paraffin wax. Four-micrometer-thick sections were then obtained for routine haematoxylin and eosin staining and immunohistochemical and histochemical procedures.

2.2. Immunohistochemistry

Immunohistochemistry against PrP^{BSE} was performed as described previously (Siso et al., 2004). Briefly, sections were immersed in formic acid and boiled at low pH in a pressure cooker with endogenous peroxidases blocked. After pre-treatment with proteinase K, the sections were incubated overnight with the primary antibody, which was either the anti-PrP mAb L42 (1:300, R-Biopharm) or the anti-PrP mAb 6H4 (1:2000, kindly provided by Prionics AG), and, finally, developed using DAKO EnVision system and 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen substrate.

Heat-induced epitope retrieval with citrate buffer (pH 6.0) was the pre-treatment used for the rest of the primary antibodies (except for SNAP 25). In these cases, the antibody binding was

Table 1
Sample origin information

	Dx	Specie	Breed	Population	Age	Sex	Post-mortem delay (h)
Case number							
1	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	5 y	Female	45–58
2	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	4 y	Female	36–48
3	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	7 y	Female	36–48
4	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	7 y	Female	36–48
5	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	6 y	Female	36–48
6	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	8 y	Female	36–48
7	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	7 y	Female	24–36
8	BSE	Bovine	Friesian	>30 m	5 y + 6 m	Female	48
9	BSE	Bovine	Friesian	Emergency	5 y + 4 m	Female	48
Control							
1	–	Bovine	Friesian	>30 m	6 y	Female	48
2	–	Bovine	Friesian	>30 m	2 y + 6 m	Female	1–3
3	–	Bovine	Friesian	>30 m	4 y	Female	1–3
4	–	Bovine	Friesian	>30 m	4 y	Female	1–3
5	–	Bovine	Friesian	>30 m	7 y	Female	1–3

Dx, diagnostic; m, months; y, years.

visualized with DAKO EnVision Plus System, either anti-rabbit for polyclonal antibodies or anti-mouse for the monoclonal ones. See Table 2 for primary antibody details.

Omission of the primary antibody was used as a negative control for the different antibodies. For positive control of C3A, retropharyngeal lymph node from each case was used.

2.3. Semi-quantitation and data analysis

The different parameters studied in the present report, such as gliosis, spongiosis and neuronal vacuolation, were semi-quantified according to the amount and/or intensity of the lesions. Other parameters were the immuno-labelling patterns of the antibodies used against PrP^{BSE}, GFAP, MT I + II (metallothioneins) and VIM (vimentin). Scoring for each parameter (either a lesion type or an immuno-labelling pattern) of each studied area was performed by a pathologist making subjective evaluation by eye, using a scale from 0 (absence) to 5 (the pattern present at its highest intensity).

For all parameters, the results are plotted as a function of the anatomical area. Areas are ordered on the X-axis in an attempt to represent the caudorostral axis of the brain. This methodology has been adapted from a previous study carried out in this laboratory where the quantification of PrP^{BSE} was plotted onto a brain PrP^{BSE} distribution curve (BPDC) (Vidal et al., 2005).

Semi-quantitation of each pattern in each brain area was statistically analysed to determine a possible relationship between the pattern described and the brain area. For ease of interpretation of the results, brain areas have been grouped into several regions, as follows:

- (1) Neocortex—including the four neocortical lobes: frontal (Fc), parietal (Pc), temporal (Tc) and occipital (Oc).
- (2) Striated body.
- (3) Paleocortex—olfactory bulb (Ob) and piriform lobe (Lp) plus Archicortex: Hippocampus (H).
- (4) Cerebellar structures—cerebellar cortex (Cc), cerebellar vermis (Cv) and cerebellar medulla (Cm).
- (5) Brain stem—thalamus (T), mesencephalon (M), pons (P), medulla oblongata (Mob) and cervical spinal cord (Sc).

SAS v8.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) and Origin 7.0 software were used for data analysis.

2.4. Affinity histochemistry

Histochemistry with *W. floribunda* biotinylated agglutinin (WFA) was performed to evaluate the status of the extracellular matrix. To visualize microglial cells, biotinylated lectin (Isolectin B4) from *Bandeiraea (Griffonia) simplicifolia* (LGS)

Table 2
Details of the primary antibodies used

	Antibody	Dilution	Species	Supplier
L42	PrP	1:300	Mouse	Rida, R-Biopharm
6H4	PrP	1:2000	Mouse	Prionics AG
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	1:400	Rabbit	Dako
VIM	Vimentin clone V9	1:200	Mouse	Dako
MT I + II	Metallothioneins I + II (E9)	1:200	Mouse	Dakocytomation
Nitrotyr	Nitrotyrosine	1:100	Mouse	Chemicon
SNAP 25	Synaptosome-associated 25 kDa protein	1:2000	Mouse	Serotec
SYN	Synaptophysin	1:100	Rabbit	Dakocytomation
C3A	Cleaved caspase 3	1:200	Rabbit	Cell signalling

was used. Deparaffinized sections, with blocked endogenous peroxidase activity, were incubated overnight with these lectins. For both lectins, the washing buffer was supplemented with CaCl_2 , $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1 mM. Finally, the binding was visualized with the ABC Complex (Pierce) and developed with 3,3'-diaminobenzidine.

2.5. Double labelling

Double labelling with glial fibrillary acidic protein (GFAP), VIM or LGS and 6H4 for PrP^{BSE} was carried out following a two-step protocol. Firstly, the sections were processed for GFAP, VIM or LGS signalling as described before, and the reaction was visualized with 3,3'-diaminobenzidine. Once washed, these sections were incubated with mAb 6H4 and the reaction was developed with 0.10% benzidine dihydrochloride and 0.025% sodium nitroferricyanide in 0.001 M phosphate buffer (pH 6) and 0.005% hydrogen peroxide. The second reaction yielded a bluish granular precipitate different from the diffuse brown staining obtained in the first reaction with 3,3'-diaminobenzidine.

3. Results

3.1. Lesion and PrP^{BSE} immuno-labelling profiles

3.1.1. Histopathological examination

Lesions observed were rather minimal and mainly confined to the brainstem.

In all BSE positive cases, an apparent spongiosis of the neuropil was observed throughout the brainstem. Intra-neuronal vacuolation was, however, almost exclusively seen in the medulla oblongata and, occasionally, in the pons, mesencephalon and the deep cerebellar nuclei. In most cases, the number of vacuolated neurons was minimal (1–3 neurons per nucleus); however, cases 4–7 presented a more intense vacuolization of the neurons.

Gliosis was also present even when neither spongiosis nor vacuolation was evident.

A few neuro-degeneration effects, such as pale, swollen or pyknotic neurons, were also spotted occasionally in the brain stem.

In the extra-cerebral organs studied, no significant morphological changes were observed.

The three main types of lesions (gliosis, spongiosis and vacuolization) were scored and compared to those obtained from the five healthy brains (Fig. 2). The likelihood ratio test yielded significant differences (p -value < 0.0001) for gliosis and spongiosis between the two groups (BSE versus healthy cattle). Vacuolation, however, was statistically invariable.

3.1.2. PrP^{BSE} immunohistochemistry

Description of PrP^{BSE} immuno-labelling patterns in cattle with BSE was previously performed in our laboratory (Siso et al., 2004). These patterns were adapted from other groups that described PrP^{Sc} deposition in scrapie-affected sheep (Gonzalez et al., 2002, 2003; Jeffrey et al., 2002, 1994) (Fig. 3).

The deposition patterns are described as follows. IN, intra-neuronal pattern (punctiform immuno-labelling into the pericarion of neurons); PN, perineuronal pattern (immuno-labelling depicting the periphery of neuronal pericaria, similar to synaptic proteins immuno-labelling); L, linear (immuno-labelling along the neural prolongations, principally axons); FP, fine punctate (immuno-labelling of small punctiform deposits in the neuropil); CG, coarse granular (immuno-labelling of bigger deposits in the neuropil than the previous); CON, confluent (immuno-labelling of aggregates big enough to merge with their neighbours in the neuropil); ST, stellate (star-shaped immuno-labelling associated with glial cells immuno-labelling).

In all nine cases, the brainstem was the most affected region. In contrast, the neocortex, particularly the occipital cortex, was the least affected area. Case 5 was the most affected case, showing PrP^{BSE} immuno-labelling in all brain sections studied; conversely, case 8 was the least affected case and did not show any PrP^{BSE} immuno-labelling in any of the cortical lobes, nor in the paleocortex or archicortex (Fig. 4).

In general, it was observed, as with the lesion profile, a great similarity with the shape of the BPDC (Vidal et al., 2005). Areas with higher amounts of PrP^{BSE} deposition showed higher scores for the different PrP^{BSE} immuno-labelling patterns. For regions in and around the brainstem, the presence of some immuno-labelling patterns at certain levels of intensity was found to be statistically dependent on the area evaluated (see Table 3). The occipital cortex was also confirmed as the least affected region, since two patterns with an intensity level of zero are dependent on this area.

Differential behaviour of the stellate pattern, associated with glial cells (Gonzalez et al., 2003), was noted. Generally, areas with lesser PrP^{BSE} deposition showed a greater presence of this pattern, certainly at lower intensity, but comparatively significant. See Fig. 4, where a peak can be seen for this pattern on the left half of the profiles, particularly due to the signalling observed in the hippocampus, but also in the neocortex. In comparison, the rest of the patterns show rather flat graphs in these regions. Moreover, in comparing the frequency tables for each pattern to the amount of PrP^{BSE} in each brain area evaluated by ELISA (Prionics[®]-Check LIA) or WB (Vidal et al., 2005), the previous observation was confirmed for the neocortex region.

Using statistical analysis, an attempt was made to corroborate this finding by calculating the κ coefficient between the incidences of pairs of the different IL patterns and the incidence of the stellate pattern in the different brain regions (Cohen, 1960). Therefore, for the neocortex region, the incidence of the stellate PrP^{BSE} immuno-labelling pattern is significantly higher than it is for any of the other immuno-labelling patterns. The κ coefficient is in the range (0.2056, 0.5221) with the following p -values for the null hypothesis of $\kappa = 0$: fine punctuate (0.0019), coarse granular (0.0484), intra-neuronal (0.0248), perineuronal (0.039) and linear (0.0235).

Extra-cerebral tissue immunohistochemistry was performed only on those tissues with a positive result in the WB, namely trigeminal ganglion and hypophysis. In the remaining tissues PrP^{BSE} was undetectable by WB. Immunohistochemistry disclosed PrP^{BSE} positivity only in satellite cells of the trigeminal

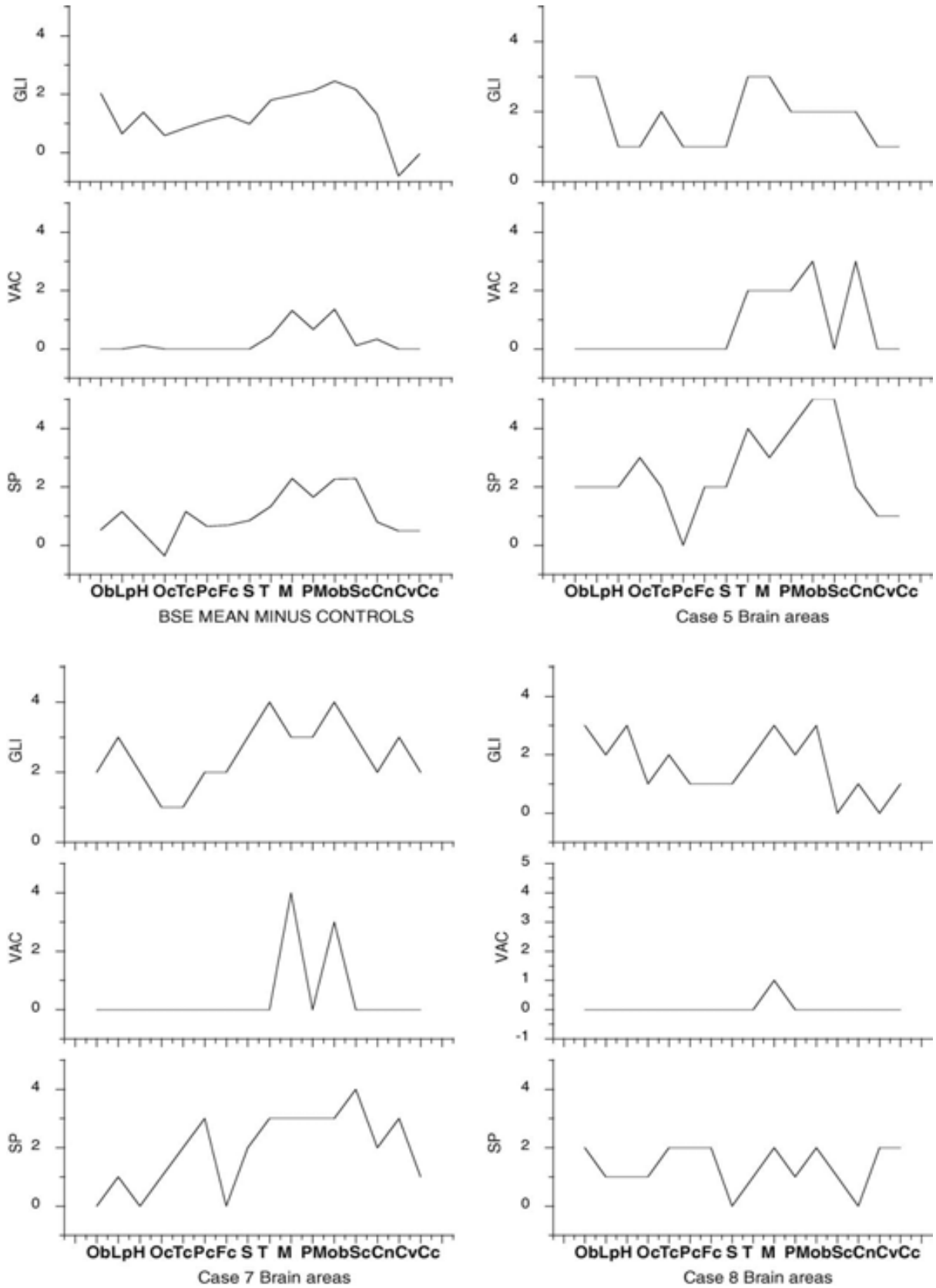


Fig. 2. Lesion profiles of the nine BSE cases (mean scores of the nine cases minus the mean scores of the five control animals) and individual profiles for the most affected case (case 5, according to its BPDC; (Vidal et al., 2005)), the least affected case (case 8), and one in between (case 7) (VAC, neuronal vacuolation; GLI, gliosis; SP, neuropil spongiosis; for brain area abbreviations see Fig. 1).

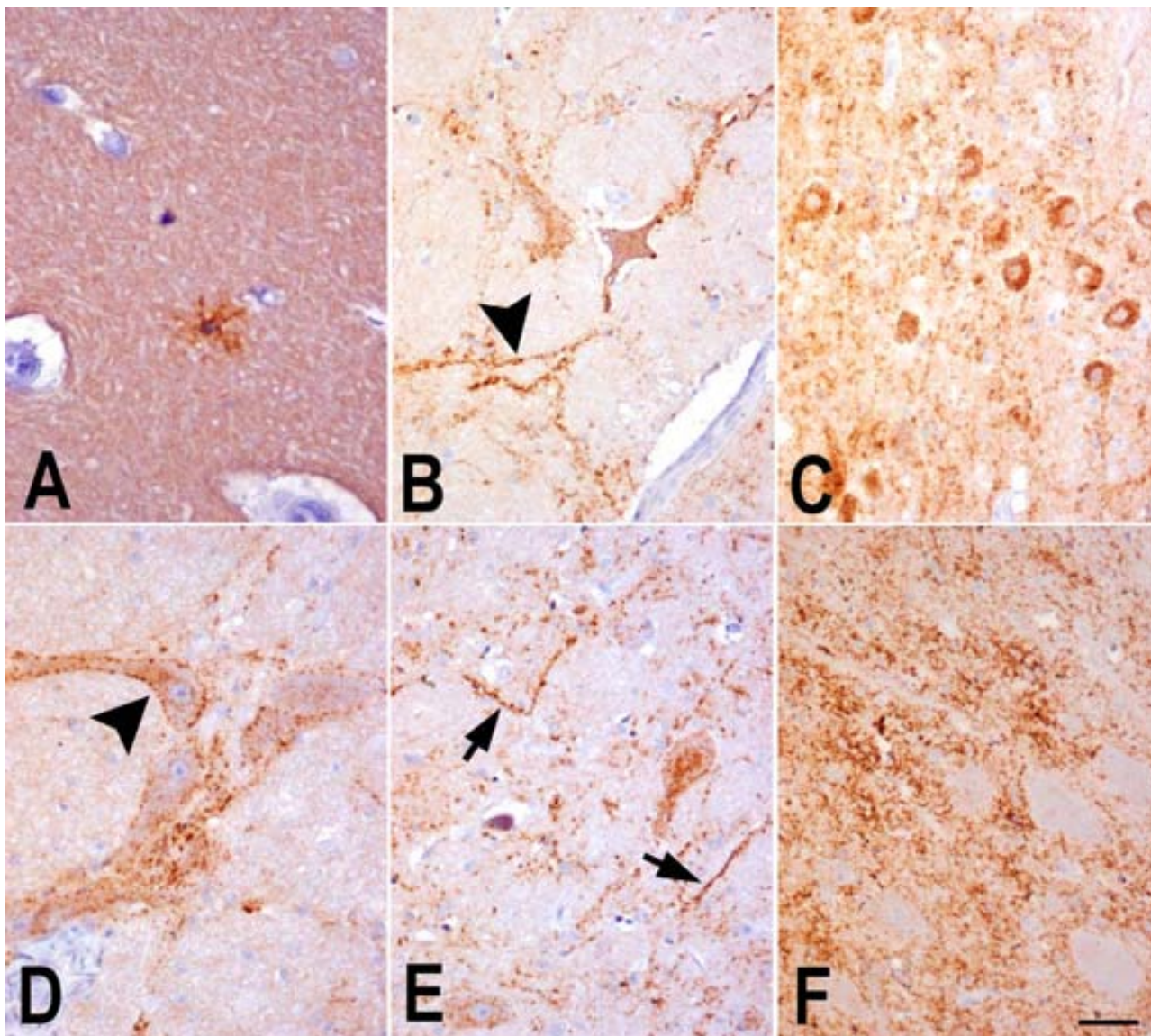


Fig. 3. PrP^{BSE} immuno-labelling patterns. Stellate (A), perineuronal (B and D, arrowheads), intraneuronal (B–D), linear (E, arrows) fine punctuate and coarse granular pattern (B, C, E, and F) (A, mAb L42 1:500 frontal cortex, bar 25 μ m; B–F, mAb 6H4 1:3000 medulla oblongata, bar 50 μ m).

ganglion in all cases studied except for case 3, which was negative (trigeminal ganglion of cases 8 and 9 were unavailable). Tissue from the hypophysis was only available for cases 1, 2, 3 and 7, and only in case 1 was a positive result obtained with WB; immuno-labelling was confined to the neurohypophysis.

3.2. Pathogenetic mechanisms

The PrP^{BSE} immuno-labelling pattern distribution and lesion profile above described permitted the estimation of a grading amongst the nine cases. Case 5 would therefore be the most affected, case 7 an intermediate case and case 8 the least-affected one (Fig. 5). We chose these three cases and a control (control 1) as representatives of the variability of time points of the course of the disease present amongst the cases studied. Using these cases, a comprehensive immunohistochemical and histochem-

ical analysis was performed. When necessary, additional BSE and control cases were used to evaluate the changes observed in the three studied cases.

3.2.1. Glial response

3.2.1.1. Glial fibrillary acidic protein. A generalized increase in GFAP signalling was observed in the three BSE brains examined when compared to the control brain (Fig. 6), principally in the pons, the mesencephalon and the piriform lobe and, secondarily, in the thalamus, striatum and medulla oblongata (Fig. 5). This increase was due to a greater number of astrocytes of larger size. Principally in the white matter, a morphological shift was often observed from ramified stellate-like to a swollen amoeboid shape.

The increase in the GFAP immuno-labelling was similarly intense in the advanced and medium BSE cases. However, in case 8 less of an increase was observed.

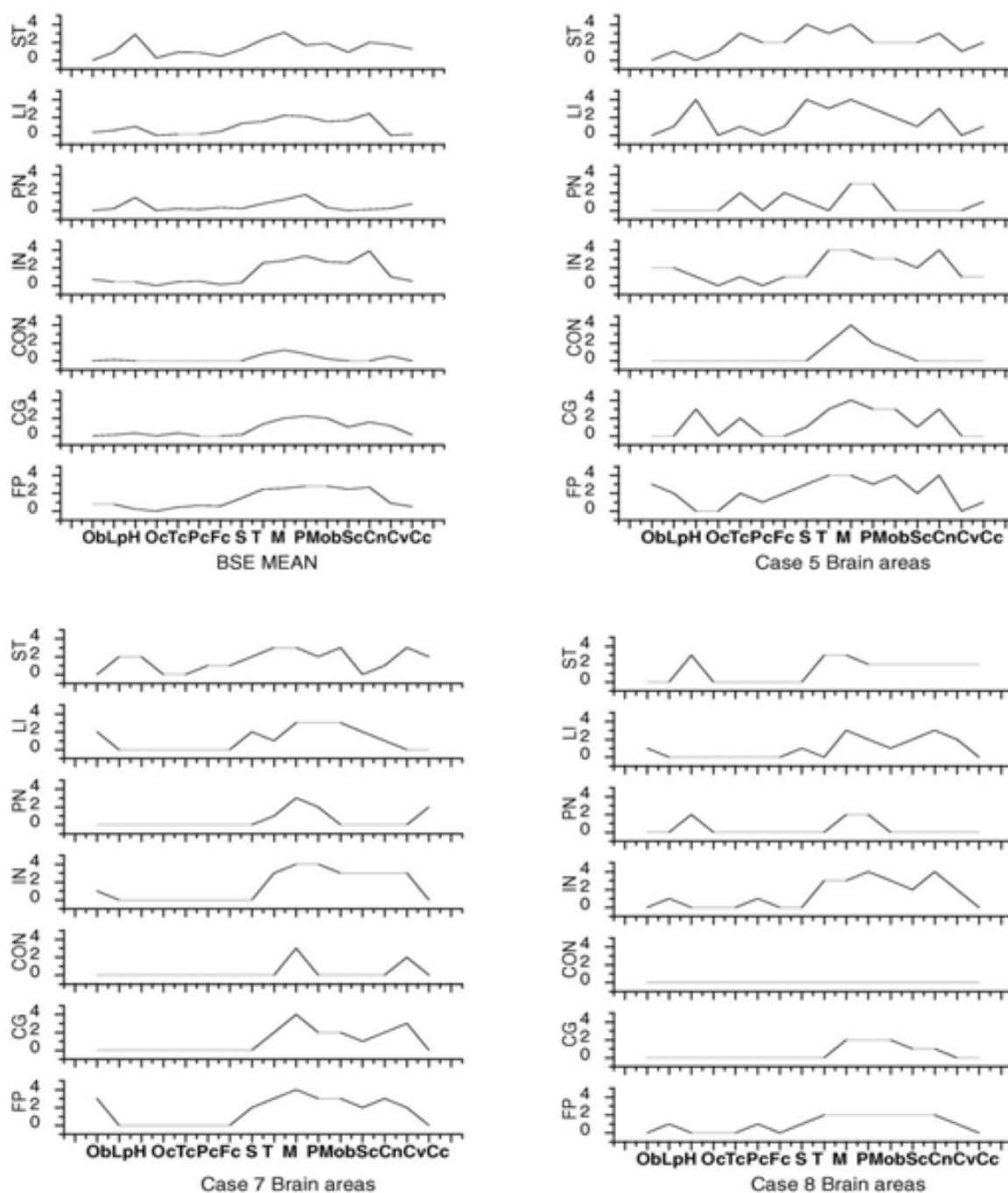


Fig. 4. PrP^{BSE} immunohistochemical pattern profiles of the nine BSE cases (mean) and the individual cases, from more to less affected, 5, 7 and 8. Note the smoother curve on the left side of the plots in cases 7 and 8 compared to the prominent peaks observed on the right side. This indicates a preferential deposition of PrP^{BSE} in areas in and around the brain stem (ST, stellate pattern; LI, linear; PN, perineuronal; IN, intraneuronal; CON, confluent; CG, coarse granular; FP, fine punctuate pattern; for brain areas abbreviations detailed in Fig. 1).

3.2.1.2. *Vimentin*. In the three BSE cases studied and the control animal vimentin epitopes were perfectly preserved (Battifora, 1991), showing a clear vimentin immuno-labelling of endothelial cells, ependymocytes, leptomeningeal cells and subventricular and submeningeal glial cells. Prolongations of the Bergman's glia of the cerebellar molecular layer were also immuno-labelled.

Only the most affected case (case 5) showed significant vimentin immuno-labelling changes compared to control and the

other two cases. These changes were principally located in the brainstem, deep cerebellar nuclei and, less intensely, in the hippocampus, striatum, piriform lobe and frontal cortex. Vimentin immuno-labelling was mainly in a stellate pattern resembling that of GFAP (Fig. 6). At the brainstem, the morphology was more hypertrophic-type astrocyte, and at more rostral sections (H, Fc and S) more finely ramified. This staining was absent in the remaining cortical lobes (i.e., temporal, parietal and occipital, see Fig. 5).

Table 3
Immuno-labelling pattern and brain area associations

Brain area	PrP ^{BSE} immunolabelling pattern						
	FP prob. <0.0001	CG prob. <0.0001	CON prob. =0.0063	IN prob. <0.0001	PN prob. 0.0003	LI prob. <0.0001	ST prob. <0.0001
Ob							0 (9.9845)
Lp							
H	0 (5.3778)				++ (5.3389)		++ (13.336)
Fc							
Tc							
Pc							
Oc	0 (7.2)			0 (6.3545)			
S							
T			+				++ (8.5952)
M			++		++	++	++ (13.336)
P	++ (10.028)	++ (7.7334)	+	++ (15.367)	+		+
Mob		+		++			
Sc		+					+
Cm		+		++			++
Cv							
Cc							

Summary of the contingency tables drawn to assess the associations of each brain area with the intensity of the different immuno-staining patterns (only significant ($p < 0.05$) associations are shown). Three intensity levels have been defined: (0) absence of pattern in that area (score 0); (+) pattern present at low intensities (scores 1 or 2); (++) pattern present at higher intensities (scores 3, 4 or 5). In parentheses, contribution to the χ^2 -statistic of each contingency table. p -Values for the hypothesis specified on the column headings (prob.); the pattern scores are the same for all brain areas. Blank cells correspond to areas where no association was found with any immuno-labelling pattern.

3.2.1.3. *Griffonia simplicifolia* lectin. Affinity histochemistry with Isolectin B1 from *Griffonia simplicifolia*, apart from labelling all kinds of vascular endothelia, enabled us to identify microglial cells in paraffin embedded bovine tissues. Healthy animals showed indications of ramified cells mainly located in the white matter, perivascular and submeningeal regions. Also, a discrete number of smaller cells, showing granular cytoplasmic staining, was observed in the grey matter.

In BSE affected animals, differences in microglial labelling were observed when compared to control animals. In some regions, such as the spinal cord, medulla oblongata, cerebellar nuclei and pons, strong grey matter neuropil signalling impaired the proper evaluation of the microglial signalling. However, other areas such as the mesencephalon, thalamus, striated body and the hippocampus showed an increase in the number of *G.*

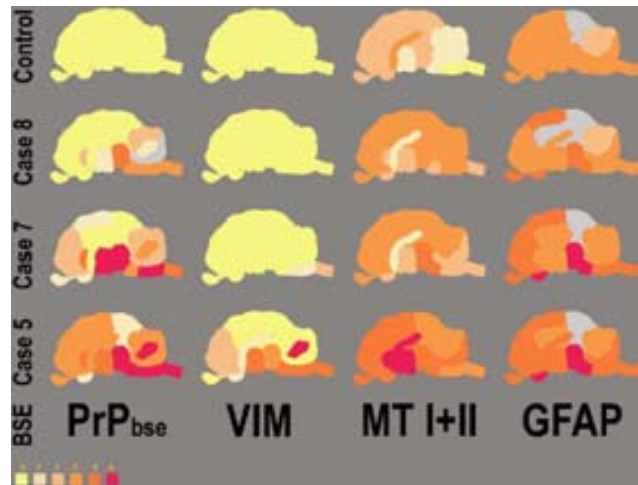


Fig. 5. Brain area schematic distribution of the semi-quantitative scoring of three BSE cases (5, 7 and 8) included in the pathogenesis study. A colour code has been applied to the semi-quantitative scoring of the different parameters evaluated (from yellow = score 0 to dark red = score 5). The parameters here included are PrP^{BSE} (as previously evaluated by Western Blotting; (Vidal et al., 2005)), GFAP (glial fibrillary acidic protein), VIM (vimentin) and MT I+II (metallothioneins I and II) (the last three evaluated by IHC). For brain areas abbreviations see Fig. 1.

simplicifolia lectin-labelled microglial cells. In those locations, an absence of neuropil background staining allowed for an easier interpretation of results. These cells were mainly ramified, but they showed a more hypertrophic morphology than those observed in control animals (Fig. 7). Amoeboid-shaped *G. simplicifolia* lectin-labelled cells were also observed, but in lower numbers. In the rest of the areas studied, differences between the control and BSE animals were minimal.

3.2.1.4. *Double labelling of glial cells and PrP^{BSE}*. Colocalization of GFAP with PrP^{BSE} was observed. Even though it is clear from our results that astrocytes do have PrP^{BSE} precipitates, it was not possible to colocalize GFAP immuno-labelling with the PrP^{BSE} stellate pattern. Colocalization was also absent between vimentin or *G. simplicifolia* lectin and the stellate pattern (Fig. 8).

3.2.2. Cellular stress, apoptosis and synaptic proteins

3.2.2.1. *Metallothionein I+II*. Signalling of endothelia, ependymocytes and submeningeal and subependymal glial cells was observed in both control and BSE brains. A generalized increase of metallothionein expression, particularly strong in the thalamus, striatum and hippocampus, was observed in the three BSE cases when compared to controls, but it was more intense in the most affected case (Fig. 5). Among the various cerebral cortical lobes, the increase of metallothionein signalling was most evident in the white matter.

The metallothionein staining pattern showed a stellate morphology corresponding to glial cells, particularly astrocyte-like ones. In the brainstem, some diffuse neuronal perikaryon staining could also be observed. This was more evident in advanced cases (Fig. 9).

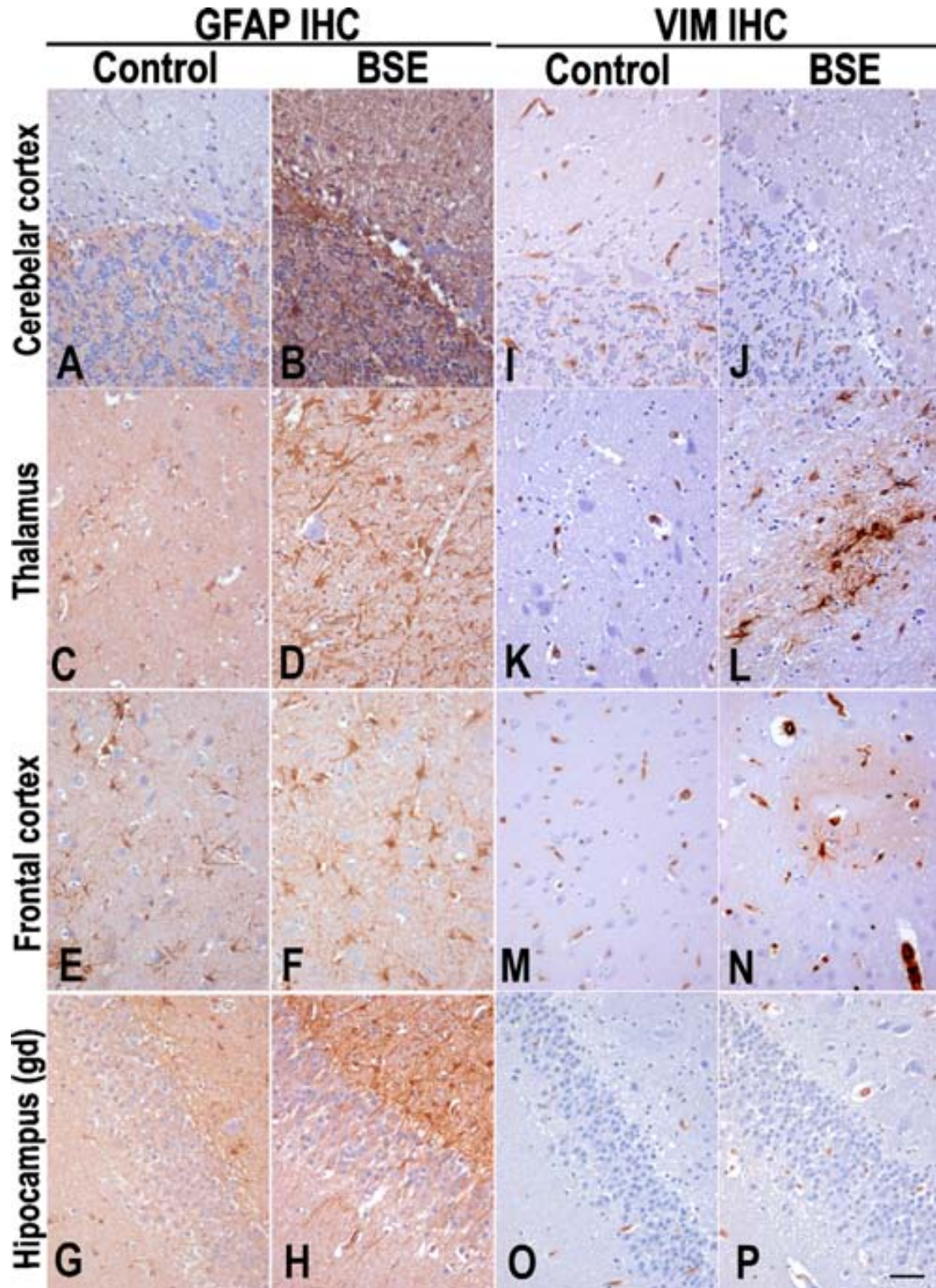


Fig. 6. Immuno-labelling for GFAP (A–H) and vimentin (I–P) in BSE case 5 (B, D, F, H, J, L, N and P) and control cattle (A, C, E, G, I, K, M and O). Note the evident increase in GFAP signalling in the different brain areas, both in number and size of astrocytes in BSE cases. Vimentin is also heavily increased in glial cells, notably in the thalamus (L) and frontal cortex (N) of the most affected BSE case. Bar 50 μ m.

In the hippocampus, the strongest metallothionein immuno-labelling increase was localized in the CA1–2 region, whereas, for instance, the CA4 was devoid of metallothionein signalling. The immuno-labelling pattern observed here, apart from the

glial intracytoplasmic staining, was a diffuse neuropil staining. Neuronal perikarya showed no staining (Fig. 9). This pattern of staining was corroborated by re-evaluating an extra BSE affected case (case 6) and another control (control 3).

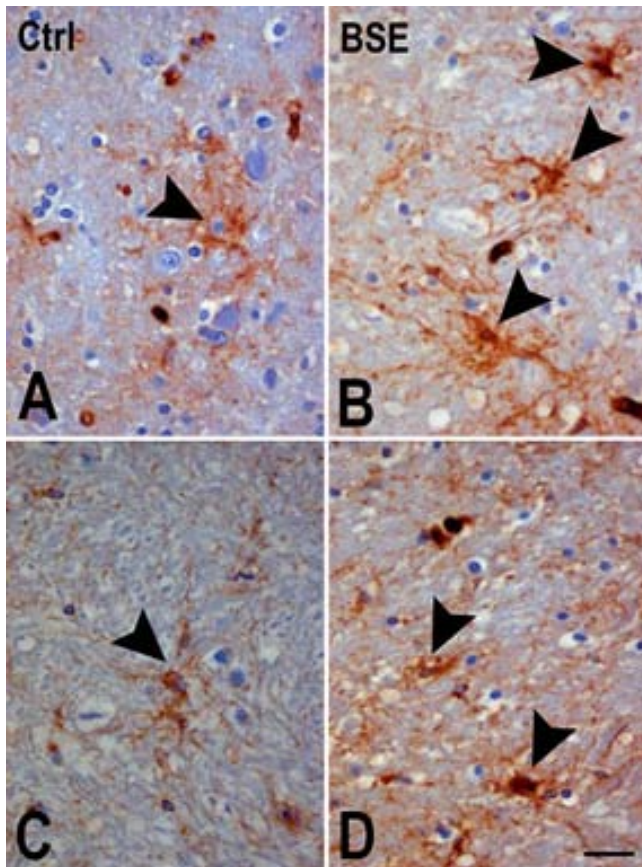


Fig. 7. Affinity histochemistry with lectin from *Griffonia simplicifolia* (LGS). Staining of microglial cells (arrows) in control (A and C) and BSE affected cattle (B and D). Note that in BSE cases the number of stained cells is slightly higher compared to control cases. Moreover, in BSE cases, microglia shows a more amoeboid (activated) morphology. Mesencephalon, bar 25 μm .

3.2.2.2. *Nitrotyrosine*. A similar nitrotyrosine intracytoplasmic granular staining of glial-like cells throughout the brains of both control and BSE cases was observed. Similarly, lipopigment-associated staining was found within neural perikarya. A little evidence of pathologic protein nitration was observed, such as IL of some spheroids or punctuate neuronal cytoplasmic IL, closely resembling the PrP^{BSE} deposit (Fig. 10).

3.2.2.3. *Cleaved caspase 3 (C3A)*. The control and BSE cases were C3A immunonegative in all brain areas studied, indicating an absence of caspase dependent apoptotic events in these cases.

3.2.2.4. *Synaptophysin (SYN)*. SYN immuno-labelling of BSE cases showed only minimal differences compared to the control. In the caudal brainstem (pons and medulla oblongata), we observed a disorganization of the signalling, which ran from a fine homogeneous perineuronal punctuated staining in the control brain to a rough granular and, in few cases, neuronal intracytoplasmic staining and staining of dystrophic neurites in BSE cases (Fig. 11). Interestingly, in areas where typical spongiform lesions were observed, the SYN immuno-labelling was preserved, particularly around vacuolated neuronal perikarya (Fig. 11).

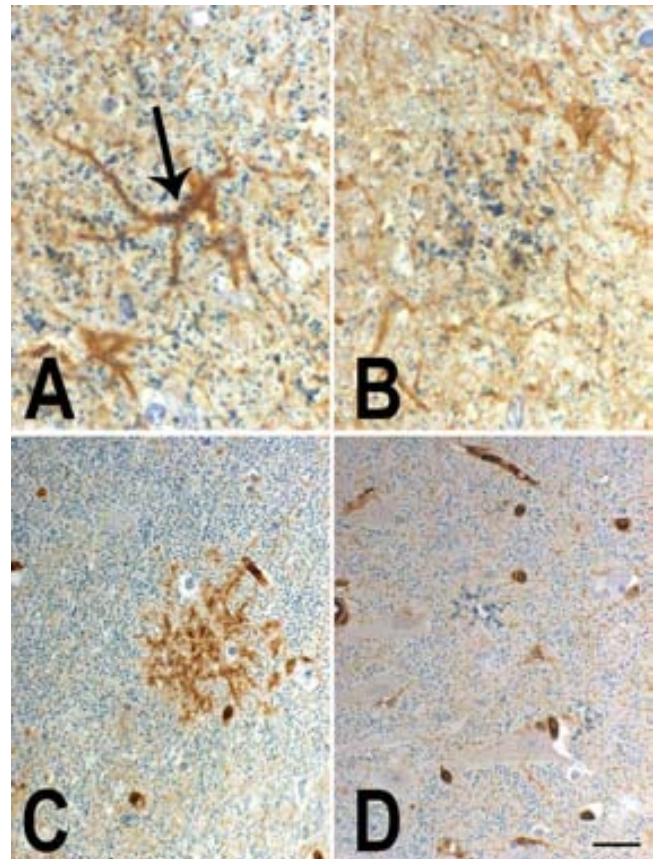


Fig. 8. Double labelling of PrP^{BSE} (blue)–GFAP (brown) (A and B) and PrP^{BSE} (blue)–*G. simplicifolia* lectin (brown) (C and D). Note a GFAP positive astrocyte with PrP^{BSE} aggregates (A, arrow) and a PrP^{BSE} stellate immuno-labelling pattern without evident colocalization with GFAP (B). Observe the *G. simplicifolia* lectin-labelled ramified microglial cell without PrP^{BSE} aggregates (C) and an example of PrP^{BSE} stellate immuno-labelling pattern with no *G. simplicifolia* lectin signalling (A and B, bar 10 μm ; C and D, bar 50 μm).

3.2.2.5. *Small synaptosome-associated 25 kDa protein*. No changes in small synaptosome-associated 25 kDa protein immuno-labelling patterns were observed when comparing BSE and control cases. Even vacuolated neurons kept their pericytoplasmic SNAP 25 staining intact (Fig. 11).

3.2.3. Extra-cellular matrix

In both BSE and controls *W. floribunda* agglutinin labelling was seen throughout the brain. The staining consisted of a strong perineuronal pattern, also following the neurites, which percolated in the surrounding neuropil with varying intensities depending on the area (Fig. 10). In the neocortex, this staining pattern was mainly seen in neurons from layers III to VI. The hippocampus and striatum showed fewer scattered neurons with perineuronal staining. Most brain stem nuclei showed an intense staining of the perineuronal nets and, occasionally, neuronal intracytoplasmic staining. Diffuse neuropil staining was also seen throughout the brainstem, but more intensely in the spinal cord substantia gelatinosa. No extra-cellular matrix disturbances were detected when comparing the BSE cases and the control.

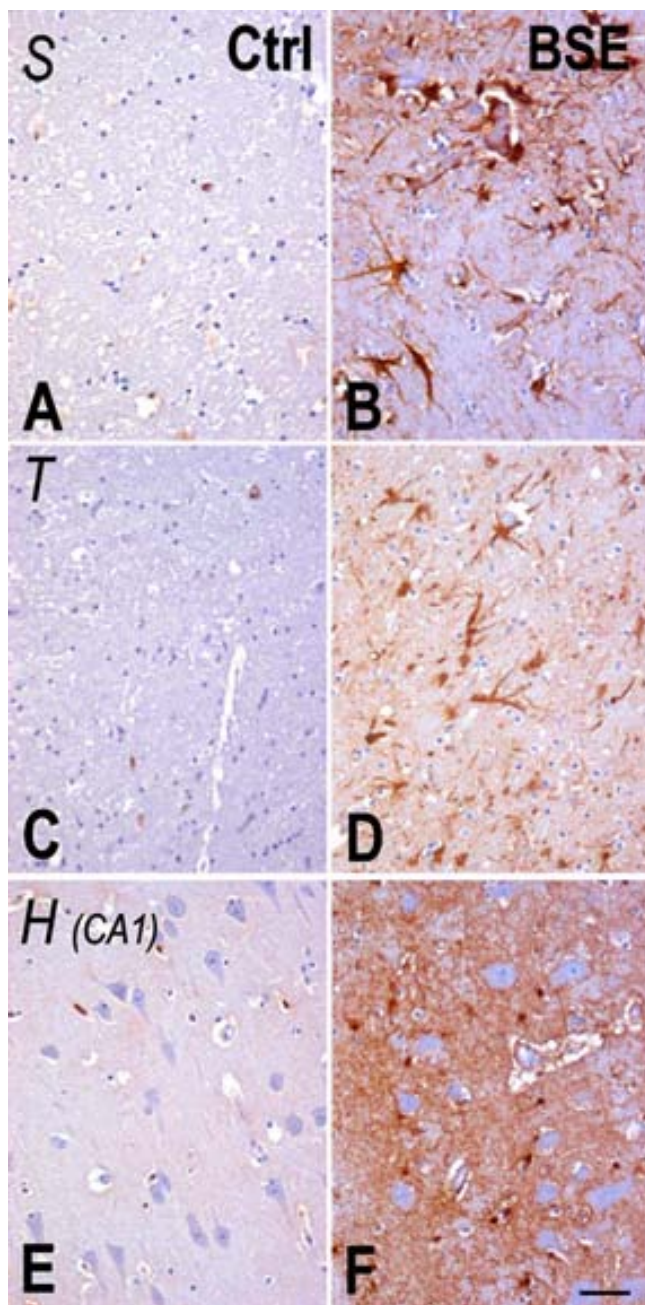


Fig. 9. MT I+II immunolabelling in BSE case 5 (B, D and F) and control cattle (A, C and E). Note a heavy increase in MT I+II signaling in astrocyte-like glial cells. S, striatum; T, thalamus; H (CA1), hippocampus cornu ammonis 1. Bar 50 μ m.

4. Discussion

All the animals included in the present study were field BSE cases detected by the active TSE surveillance programme in Catalonia. None of these BSE cases showed clinical symptoms. Additionally, the rather mild neuropathological lesions found in the present study would indicate that all these cases were at an early stage of the disease.

The study of early BSE cases is of special interest in determining the pathogenic effects of incipient PrP^{BSE} accumulation without interference from neuronal death events occurring later

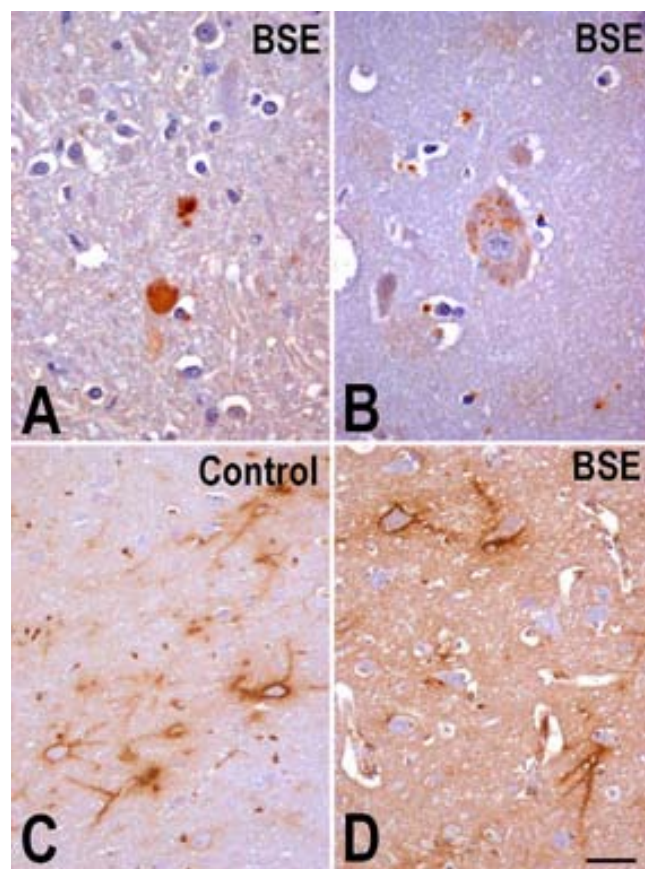


Fig. 10. Nitrotyrosine immunolabelling of dystrophic neurites (A) and intracytoplasmic (PrP^{BSE} deposit-like) granules (B) in BSE cattle and WFA labelling of perineuronal nets of the frontal cortex in control (C) and BSE cattle (D). No apparent changes in the extra-cellular matrix have been detected (A and B, pons, bar 25 μ m; C and D, frontal cortex, bar 50 μ m).

in the disease. Furthermore, knowledge of early BSE processes would allow, in the future, the identification of possible diagnostic or therapeutic targets at a point in the disease when there is still for the possibility of protection against neurodegeneration. Interesting attempts to characterize neuropathologically the CNS changes occurring in BSE cases in cattle have been published, but these have either involved a rather limited number of animals (Debeer et al., 2003) or have focused mainly on the study of the brain stem (Miyashita et al., 2004; Wells and Wilesmith, 1995).

Despite the limited size of the sample examined in this study, an exploratory study was carried out and analysis of PrP^{BSE} deposition profiles revealed that several immunolabelling patterns are statistically dependent on specific brain regions (Table 3). Such a regional tropism of certain immunolabelling patterns had been reported previously by other groups working with scrapie-infected sheep (Gonzalez et al., 2003). In examining our cases, then, a strong tropism for the regions in and around the brain stem is seen, specially the pons and mesencephalon, where not only was an association of the patterns with specific brain areas noticed, but also at a greater intensity. This is particularly relevant with neurone-associated patterns, such as intraneuronal or perineuronal ones.

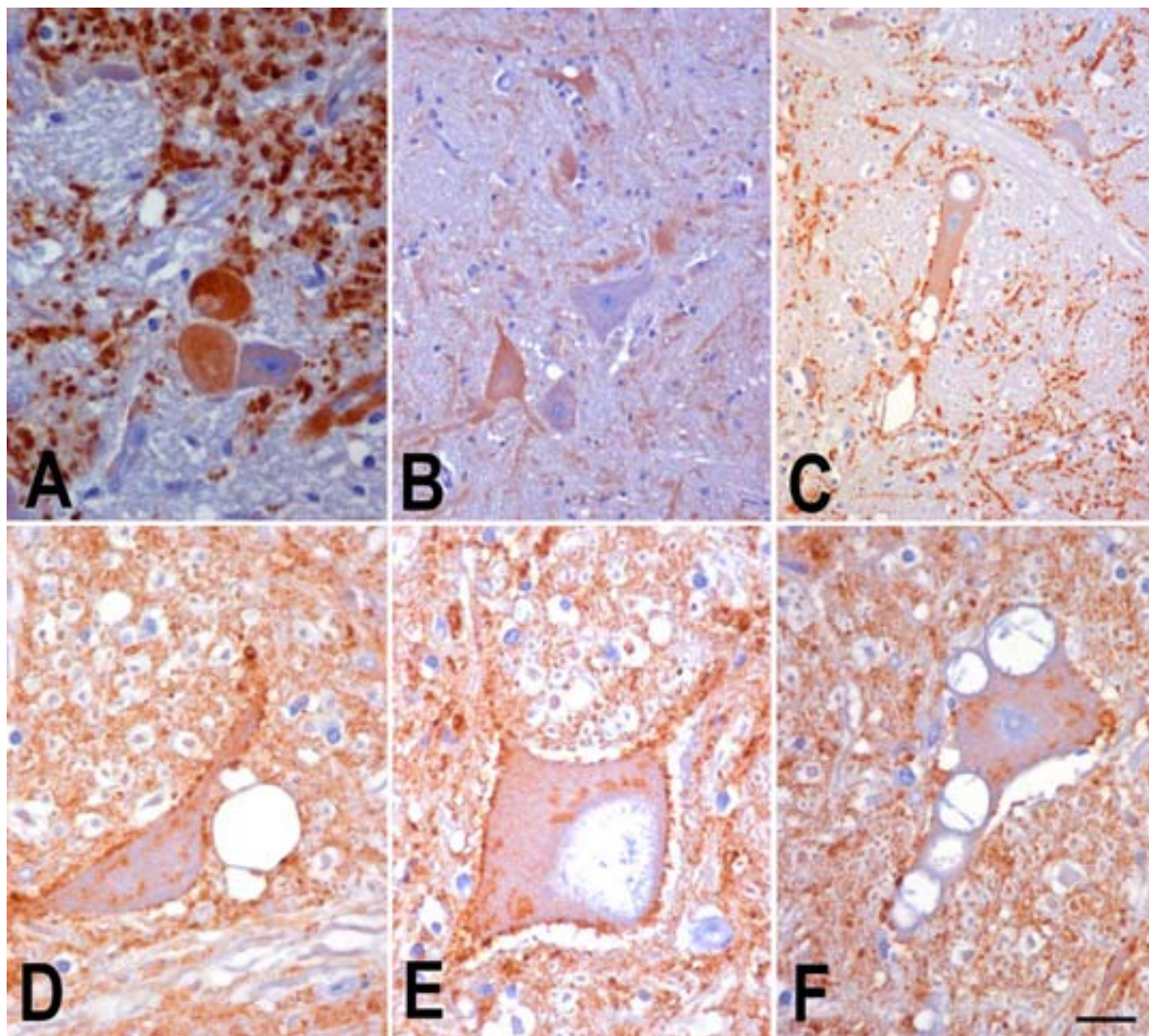


Fig. 11. Immuno-labelling of synaptophysin (A–C) and SNAP 25 (D–F). Note dystrophic neurites (A) and perikarya (B) containing SYN. Vacuolated neuronal bodies have their perineuronal staining preserved (C). SNAP 25 signalling is seen within intracytoplasmic granules (D–F) and also depicting vacuolated neurons (medulla oblongata; A, D, E and F, bar 25 μm ; B and C, bar 50 μm).

This observation in natural BSE is in accordance with the theory of a nerve cell mediated entrance for the prion into the brain through this region, the brain stem, which has been suggested for hamster and sheep scrapie experimental models (Beekes et al., 1998; van Keulen et al., 2002) and also for nvCJD (Ghosh, 2002).

PrP^{BSE} IL-pattern distribution studies have also revealed a different behaviour of the stellate pattern, associated with glial cells (Gonzalez et al., 2003). This pattern appears significantly at a higher frequency, compared with other patterns, in regions with rather limited PrP^{BSE} deposition (as evaluated by WB and ELISA) (Vidal et al., 2005). This suggests a particular role for glial cells in the spread of PrP^{BSE}, maybe as carriers of the BSE agent from the brain stem (areas where PrP^{BSE} is presumably initially deposited) to rostral regions of the CNS such as the neocortex.

Double labelling was performed to identify the nature of PrP^{BSE} stellate IL pattern. No colocalization of the PrP^{BSE}

stellate immuno-labelling pattern was observed with GFAP, vimentin or *G. simplicifolia* lectin. In agreement with this result, the stellate IL pattern had not been related in sheep to GFAP signalling (van Keulen et al., 1995). Yet the PrP stellate immuno-labelling pattern is believed by some investigators to correspond to astrocytes (Gonzalez et al., 2003). However, GFAP positive astrocytes bearing granular PrP^{BSE} deposits were identified in this study. In scrapie-affected sheep, PrP^{Sc} deposition has been observed within astrocytes (Andreoletti et al., 2002; van Keulen et al., 1995) and microglia (Andreoletti et al., 2002). Our results could be explained by the accumulation of PrP^{BSE} in protoplasmic astrocytes where GFAP is not expressed, or, more probably, by the impaired GFAP expression in a heavy PrP^{BSE} accumulation environment. However, a microglial origin of the PrP^{BSE} stellate pattern cannot be ruled out. This is, to our knowledge, the first description of colocalization of PrP^{BSE} and GFAP in BSE cattle.

The reaction of glial cells (called neuro-inflammation) either causing neuro-degeneration or being its consequence, is different from the inflammation developed by the classical immune system. Several studies carried out on TSE models have demonstrated that neuro-inflammation is widely involved in prion diseases (Baker and Manuelidis, 2003; Baker et al., 2002; Perry et al., 2002; Siso et al., 2002). Moreover, cell culture studies have strongly demonstrated the involvement of both microglia and astrocytes in the response to pathologic prion protein deposition (Brown, 2001; Marella and Chabry, 2004; Marella et al., 2005). According to our results, PrP^{BSE} deposition in cattle induces a generalized astrocytic response, evidenced by a marked increase of GFAP immuno-labelling, the intensity of which parallels the intensity of PrP^{BSE} deposition.

Furthermore, increased immuno-labelling within astrocyte cytoplasm of both vimentin and I + II markers was detected, but only in advanced cases.

Vimentin is an intermediate filament expressed in the early stages of astrocyte development. Re-expression of vimentin by rat astrocytes has been correlated to migration functions (Wang et al., 2004). According to our results vimentin re-expression occurs only when PrP^{BSE} deposition is well established; this apparently does not support the hypothesis that astrocytes are the one cell-type carrying the infective agent to more rostral parts of the brain or, at least, not the ones expressing vimentin. Hence one could hypothesize that the role of vimentin-expressing astrocytes in BSE might merely be a reaction to the neuro-degeneration events already occurring in rather advanced cases.

Cellular PrP (PrPc) is implicated in the copper metabolism and maintenance of the redox equilibrium (Brown, 2004; Brown and Mohn, 1999; Giese and Kretzschmar, 2001; Kramer et al., 2001; Viles et al., 1999). Immuno-labelling of the copper-binding proteins metallothionein I + II was carried out because of their function in the detoxification of heavy metal ions. Among human prionopathies, metallothionein up-regulation has been described in early stages of CJD (Kawashima et al., 2000), as well as in many other human neuro-degenerative diseases such as Alzheimer disease, Pick's disease and amyotrophic lateral sclerosis (Diedrich et al., 1991; Duguid et al., 1989, 1988; Sillevius Smitt et al., 1992). Previous studies performed on BSE cases have shown an increase in metallothionein I + II immuno-labelling (Hanlon et al., 2002). An increase was observed in metallothionein signalling parallel to increased GFAP immuno-labelling, PrP^{BSE} deposition and vacuolation. Increased metallothionein expression would be a consequence of the presence of reactive oxygen and nitrogen species enhanced by metal ions released during neuro-inflammation (Hidalgo et al., 2001). So, then, in view of our results, we could argue that metallothioneins in BSE play a protective role against free radicals generated during the neuro-inflammation events described in the most advanced BSE cases. An antibody against nitrated tyrosine residues, a marker for oxidative stress consequences on proteins, was used to determine the extent of such events in our cases. However, this technique disclosed little evidence of protein nitration.

It was not possible to characterize fully the microglial response in our BSE cases because of suboptimal processing of

the samples (long post-mortem delay) and limited performance of the marker used (*G. simplicifolia* lectin). However, the *G. simplicifolia* lectin affinity histochemistry performed here has enabled us to confirm microglial activation in early BSE pathogenesis. It thus remains to be determined whether microglial activation is actually triggering the astrocytic reaction, as has been suggested in the literature by a number of TSE in vitro model studies (Brown and Kretzschmar, 1997; Marella and Chabry, 2004; Marella et al., 2005).

The neuronal loss observed in human prionopathies and experimental TSE models has been attributed to programmed cell death processes (Ferrer, 2002; Giese et al., 1995; Lucassen et al., 1995; Puig and Ferrer, 2001; Siso et al., 2002). However, the brains of the BSE cases here studied were immunonegative for the apoptotic protein caspase 3 (C3A). In previous reports based in DNA in situ end labelling, little evidence of apoptosis was found in BSE-affected cattle brains (Debeer et al., 2003). The phagocytosis of apoptotic cells is quite efficient ($T_{1/2} = 2-4$ h) (Leist and Nicotera, 1998), making even baseline apoptosis events difficult to pinpoint. Possible caspase-independent cell death pathways were not studied. Therefore our results exclude the caspase dependent apoptotic pathway in early BSE pathogenesis in cattle.

Synaptic protein disorders have been related to clinical manifestations in a number of human and animal prionopathies (Belichenko et al., 2000; Ferrer, 2002; Ferrer et al., 2000, 1999; Jeffrey et al., 2000; Russelakis-Carneiro et al., 2004; Siso et al., 2002). This phenomenon is not surprising since PrPc is closely associated with the synaptic machinery (Herms et al., 1999; Lasmezas, 2003; Moya et al., 2000). Synaptic protein immuno-labelling (SNAP 25 and synaptophysin) of the brains of our early BSE cases has shown only small differences when compared to control animals. In vacuolated neurons of the BSE cases, a preservation of both markers' staining was observed, suggesting a minimal alteration of synaptic proteins in early stages of the disease. The absence of reported clinical signs in these cases could be explained by the absence of incipient synaptic alterations. In fact, similar published studies carried out on BSE cases have shown slight changes (Miyashita et al., 2004) or none at all (Debeer et al., 2003) in synaptic immuno-labelling.

PrPc is located in the outer surface of the cell membrane and interacts with various CNS extra-cellular matrix glycosaminoglycans such as heparan sulphate (Horonchik et al., 2005; McBride et al., 1998). Moreover, PrPc has also been associated with neurite growth and plasticity phenomena (Sales et al., 2002). Disruption of perineuronal nets associated with the presence of pathologic prion protein has been described in CJD cases in human beings (Belichenko et al., 1999). However, in the present study, examination of our BSE cases with *W. floribunda* agglutinin, a general marker for perineuronal nets (Belichenko et al., 1999; Hilbig et al., 2001), has shown that even around vacuolated neurons there is a preservation of the morphology of the extra-cellular matrix. Studies on terminal BSE cases should be performed to investigate whether the matrix suffers any alterations in later phases of the disease.

In summary, the neuropathogenesis studies carried out on early BSE cases suggest that neuro-inflammation events,

particularly those involving glial activation, are of great significance in the early pathology of BSE. Further studies must be carried out to determine the implications of oxidative stress and activation of both astroglial and microglial cell lines in early BSE pathogenesis. Ideally these studies should also include animals at later phases of the disease (i.e., with clinical manifestations). The importance of taking advantage of the samples originating in naturally occurring field cases is stressed, although caution must be applied when interpreting the results, as some factors (post-mortem delay, incubation period, dose of infection, strain of infectious agent, etc.) are not under the control achieved in an experimental approach.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the excellent technical support of Sierra Espinar, Marta Valle, Anna Maria Llorens and Ivan Cerdón of the Priocat Laboratory, CRESA. We also wish to thank: Anabel Blasco and Anna Espinal of the UAB statistical service; slaughterhouses: Vall d'En Bas, Fricorsa, Carnissers d'Osona, Sabadell; Valira, Vinyals; Anna Alba, CRESA; Tom Yohannan for editorial help. This study was made possible thanks to the financial support of the Department of Health and the Department of Agriculture, Livestock Rearing and Fisheries of the Catalan Government (Generalitat de Catalunya). It was partially financed by the project with reference ET2002-05168-C04-01 of the Spanish Ministry of Science and Technology (MCyT).

References

- Andreoletti, O., Berthon, P., Levasseur, E., Marc, D., Lantier, F., Monks, E., Elsen, J.M., Schelcher, F., 2002. Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labelling immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 50 (10), 1357–1370.
- Badiola, J.J., Monleon, E., Monzon, M., Acin, C., Lujan, L., Fernandez, D., Simmons, M., Vargas, A., 2002. Description of the first cases of BSE in Spain. *Vet. Rec.* 151 (17), 509–510.
- Baker, C.A., Manuelidis, L., 2003. Unique inflammatory RNA profiles of microglia in Creutzfeldt–Jakob disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2), 675–679.
- Baker, C.A., Martin, D., Manuelidis, L., 2002. Microglia from Creutzfeldt–Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J. Virol.* 76 (21), 10905–10913.
- Barlow, R.M., 1972. Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R. Coll. Pathol.)* 6, 102–109.
- Battifora, H., 1991. Assessment of antigen damage in immunohistochemistry. The vimentin internal control. *Am. J. Clin. Pathol.* 96 (5), 669–671.
- 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.
- Belichenko, P.V., Brown, D., Jeffrey, M., Fraser, J.R., 2000. Dendritic and synaptic alterations of hippocampal pyramidal neurones in scrapie-infected mice. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26 (2), 143–149.
- Belichenko, P.V., Miklossy, J., Belsler, B., Budka, H., Celio, M.R., 1999. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurobiol. Dis.* 6 (4), 269–279.
- Bolton, D.C., McKinley, M.P., Prusiner, S.B., 1982. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science* 218 (4579), 1309–1311.
- Brown, D.R., 2001. Microglia and prion disease. *Microsc. Res. Tech.* 54 (2), 71–80.
- Brown, D.R., 2004. Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiol. Dis.* 15 (3), 534–543.
- Brown, D.R., Kretzschmar, H.A., 1997. Microglia and prion disease: a review. *Histol. Histopathol.* 12 (3), 883–892.
- Brown, D.R., Mohn, C.M., 1999. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia* 25 (3), 282–292.
- Bruce, M.E., Will, R.G., Ironside, J.W., McConnell, I., Drummond, D., Suttie, A., McCordle, L., Chree, A., Hope, J., Birkett, C., Cousens, S., Fraser, H., Bostock, C.J., 1997. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature* 389 (6650), 498–501.
- Cohen, J., 1960. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ. Psychol. Meas.* 20, 37–46.
- Collinge, J., Sidle, K.C., Meads, J., Ironside, J., Hill, A.F., 1996. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature* 383 (6602), 685–690.
- Creutzfeldt, H.G., 1989. On a particular focal disease of the central nervous system (preliminary communication), 1920. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 3 (1/2), 3–25.
- Debeer, S., Baron, T., Bencsik, A., 2003. Neuropathological characterisation of French bovine spongiform encephalopathy cases. *Histochem. Cell Biol.* 120 (6), 513–521.
- Diedrich, J.F., Minnigan, H., Carp, R.I., Whitaker, J.N., Race, R., Frey II, W., Haase, A.T., 1991. Neuropathological changes in scrapie and Alzheimer's disease are associated with increased expression of apolipoprotein E and cathepsin D in astrocytes. *J. Virol.* 65 (9), 4759–4768.
- Duguid, J.R., Bohmont, C.W., Liu, N.G., Tourtellotte, W.W., 1989. Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86 (18), 7260–7264.
- Duguid, J.R., Rohwer, R.G., Seed, B., 1988. Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85 (15), 5738–5742.
- Ferrer, I., 2002. Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt–Jakob disease. *Cerebellum* 1 (3), 213–222.
- Ferrer, I., Puig, B., Blanco, R., Marti, E., 2000. Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt–Jakob disease. *Neuroscience* 97 (4), 715–726.
- Ferrer, I., Rivera, R., Blanco, R., Marti, E., 1999. Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt–Jakob disease. *Neurobiol. Dis.* 6 (2), 92–100.
- Gajdusek, D.C., Zigas, V., 1957. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N. Engl. J. Med.* 257 (20), 974–978.
- Gertsmann, J., 1928. Über ein noch nicht beschriebenes reflexphanomen bei einer Erkrankung des zerebellaren systems. *Wien. Med. Wochenschr.* 78, 906–934.
- Ghosh, S., 2002. Intestinal entry of prions. *Z. Gastroenterol.* 40 (1), 37–39.
- Giese, A., Groschup, M.H., Hess, B., Kretzschmar, H.A., 1995. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* 5 (3), 213–221.
- Giese, A., Kretzschmar, H.A., 2001. Prion-induced neuronal damage—the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 253, 203–217.
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M., Jeffrey, M., 2002. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J. Comp. Pathol.* 126 (1), 17–29.
- Gonzalez, L., Martin, S., Jeffrey, M., 2003. Distinct profiles of PrP immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J. Gen. Virol.* 84 (5), 1339–1350.
- Hadlow, W.J., Eklund, C.M., 1968. Scrapie—a virus-induced chronic encephalopathy of sheep. *Res. Publ. Assoc. Res. Nerv. Ment. Dis.* 44, 281–306.
- Hanlon, J., Monks, E., Hughes, C., Weavers, E., Rogers, M., 2002. Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J. Comp. Pathol.* 127 (4), 280–289.

- Herms, J., Tings, T., Gall, S., Madlung, A., Giese, A., Siebert, H., Schurmann, P., Windl, O., Brose, N., Kretzschmar, H., 1999. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J. Neurosci.* 19 (20), 8866–8875.
- Hidalgo, J., Aschner, M., Zatta, P., Vasak, M., 2001. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res. Bull.* 55 (2), 133–145.
- Hilbig, H., Bidmon, H.J., Blohm, U., Zilles, K., 2001. *Wisteria floribunda* agglutinin labeling patterns in the human cortex: a tool for revealing areal borders and subdivisions in parallel with immunocytochemistry. *Anat. Embryol. (Berl.)* 203 (1), 45–52.
- Horonchik L., Tzaban S., Ben-Zaken, O., Yedia, Y., Rouvinski, A., Papy-Garcia, D., Barritault, D., Vlodaysky, I., Taraboulos, A., 2005. Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J. Biol. Chem.*
- Jakob, A., 1989. Concerning a disorder of the central nervous system clinically resembling multiple sclerosis with remarkable anatomic findings (spastic pseudosclerosis). Report of a fourth case. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 3 (1/2), 26–45.
- Jeffrey, M., Begara-McGorum, I., Clark, S., Martin, S., Clark, J., Chaplin, M., Gonzalez, L., 2002. Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J. Comp. Pathol.* 127 (4), 264–273.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Bruce, M., McBride, P.A., Scott, J.R., Halliday, W.G., 1994. Correlative light and electron microscopy studies of PrP localisation in 87V scrapie. *Brain Res.* 656 (2), 329–343.
- Jeffrey, M., Halliday, W.G., Bell, J., Johnston, A.R., MacLeod, N.K., Ingham, C., Sayers, A.R., Brown, D.A., Fraser, J.R., 2000. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26 (1), 41–54.
- Kawashima, T., Doh-ura, K., Torisu, M., Uchida, Y., Furuta, A., Iwaki, T., 2000. Differential expression of metallothioneins in human prion diseases. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 11 (5), 251–262.
- Kramer, M.L., Kratzin, H.D., Schmidt, B., Romer, A., Windl, O., Liemann, S., Hornemann, S., Kretzschmar, H., 2001. Prion protein binds copper within the physiological concentration range. *J. Biol. Chem.* 276 (20), 16711–16719.
- Lasmezas, C.I., 2003. Putative functions of PrP(C). *Br. Med. Bull.* 66, 61–70.
- Legname, G., Baskakov, I.V., Nguyen, H.O., Riesner, D., Cohen, F.E., DeArmond, S.J., Prusiner, S.B., 2004. Synthetic mammalian prions. *Science* 305 (5684), 673–676.
- Leist, M., Nicotera, P., 1998. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp. Cell Res.* 239 (2), 183–201.
- Lucassen, P.J., Williams, A., Chung, W.C., Fraser, H., 1995. Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci. Lett.* 198 (3), 185–188.
- Lugaresi, E.M.R., Montagna, P., Baruzzi, A., Cortelli, P., Lugaresi, A., Tinuper, P., Zucconi, M., Gambetti, P., 1986. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of the thalamic nuclei. *N. Engl. J. Med.* 315, 997–1003.
- Marella, M., Chabry, J., 2004. Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J. Neurosci.* 24 (3), 620–627.
- Marella, M., Gaggioli, C., Batoz, M., Deckert, M., Tartare-Deckert, S., Chabry, J., 2005. Pathological prion protein exposure switches on neuronal mitogen-activated protein kinase pathway resulting in microglia recruitment. *J. Biol. Chem.* 280 (2), 1529–1534.
- McBride, P.A., Wilson, M.I., Eikelenboom, P., Tunstall, A., Bruce, M.E., 1998. Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. *Exp. Neurol.* 149 (2), 447–454.
- Miyashita, M., Stierstorfer, B., Schmahl, W., 2004. Neuropathological findings in brains of Bavarian cattle clinically suspected of bovine spongiform encephalopathy. *J. Vet. Med. B: Infect. Dis. Vet. Publ. Health* 51 (5), 209–215.
- Moya, K.L., Sales, N., Hassig, R., Creminon, C., Grassi, J., Di Giambardino, L., 2000. Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc. Res. Tech.* 50 (1), 58–65.
- Pearson, G.R., Gruffydd-Jones, T.J., Wyatt, J.M., Hope, J., Chong, A., Scott, A.C., Dawson, M., Wells, G.A., 1991. Feline spongiform encephalopathy. *Vet. Rec.* 128 (22), 532.
- Perry, V.H., Cunningham, C., Boche, D., 2002. A typical inflammation in the central nervous system in prion disease. *Curr. Opin. Neurol.* 15 (3), 349–354.
- Puig, B., Ferrer, I., 2001. Cell death signaling in the cerebellum in Creutzfeldt–Jakob disease. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 102 (3), 207–215.
- Russelakis-Carneiro, M., Hetz, C., Maundrell, K., Soto, C., 2004. Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts. *Am. J. Pathol.* 165 (5), 1839–1848.
- Sales, N., Hassig, R., Rodolfo, K., Di Giambardino, L., Traiffort, E., Ruat, M., Fretier, P., Moya, K.L., 2002. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur. J. Neurosci.* 15 (7), 1163–1177.
- Sillevis Smitt, P.A., Blaauwgeers, H.G., Troost, D., de Jong, J.M., 1992. Metallothionein immunoreactivity is increased in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci. Lett.* 144 (1/2), 107–110.
- Siso, S., Ordoñez, M., Cerdón, I., Vidal, E., Pumarola, M., 2004. Distribution of PrPres in the brains of BSE-affected cows detected by active surveillance in Catalonia, Spain. *Vet. Rec.* 155, 524–525.
- Siso, S., Puig, B., Varea, R., Vidal, E., Acin, C., Prinz, M., Montrasio, F., Badiola, J., Aguzzi, A., Pumarola, M., Ferrer, I., 2002. Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 103 (6), 615–626.
- van Keulen, L.J., Schreuder, B.E., Meloen, R.H., Poelen-van den Berg, M., Mooij-Harkes, G., Vromans, M.E., Langeveld, J.P., 1995. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet. Pathol.* 32 (3), 299–308.
- van Keulen, L.J., Vromans, M.E., van Zijderveld, F.G., 2002. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apim 110* (1), 23–32.
- Vidal, E., Márquez, M., Ordoñez, M., Raeber, A., Struckmeyer, T., Oesch, B., Siso, S., Pumarola, M., 2005. Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests. *J. Virol. Meth.* 127 (1), 24–32.
- Viles, J.H., Cohen, F.E., Prusiner, S.B., Goodin, D.B., Wright, P.E., Dyson, H.J., 1999. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96 (5), 2042–2047.
- Wang, K., Bekar, L.K., Furber, K., Walz, W., 2004. Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res.* 1024 (1/2), 193–202.
- Wells, G.A., Scott, A.C., Johnson, C.T., Gunning, R.F., Hancock, R.D., Jeffrey, M., Dawson, M., Bradley, R., 1987. A novel progressive spongiform encephalopathy in cattle. *Vet. Rec.* 121 (18), 419–420.
- Wells, G.A., Wilesmith, J.W., 1995. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol.* 5 (1), 91–103.
- Wilesmith, J.W., Wells, G.A., Cranwell, M.P., Ryan, J.B., 1988. Bovine spongiform encephalopathy: epidemiological studies. *Vet. Rec.* 123 (25), 638–644.
- Williams, E.S., Young, S., 1980. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J. Wildl. Dis.* 16 (1), 89–98.

Treball núm. 4

Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains

Vidal E, Bolea R, Tortosa R, Costa C, Domènech A, Monleón E, Vargas A, Badiola JJ, Pumarola M.
2005 Enviat a Journal of Virological Methods.

Assessment of calcium-binding proteins (Parvalbumin and Calbindin D-28K) and perineuronal nets in normal and scrapie-affected adult sheep brains

Vidal, Enric^a; Bolea, Rosa^b; Tortosa, Raül^c; Costa, Carme^c; Domènech, Anna^c; Monleón, Eva^b; Vargas, Antonia^b; Badiola, Juan Jose^b and Pumarola, Martí^{a,c,d,*}

^a PRIOCAT Laboratory, CReSA

^c Department of Animal Medicine and Surgery - Institute of Neuroscience

^d Animal Tissue Bank of Catalunya (BTAC)

Veterinary Faculty *Universitat Autònoma de Barcelona*
08193, Bellaterra (Cerdanyola del Vallès) Barcelona, Spain

^b National Reference Centre for Transmissible Spongiform Encephalopathies. University of Zaragoza.
Miguel Servet, 177. 50013 Zaragoza, Spain.

* Corresponding Author: marti.pumarola@uab.es

Abstract

Scrapie is a prion disease in small ruminants that manifests itself with neurological clinical signs amongst which are ataxia and tremors. These signs can be partially explained by an imbalance in central inhibitory innervation. The study of the brain's inhibitory neuronal GABAergic populations and of their extracellular matrix has been used to define, in part, the pathogenesis of human prion diseases and scrapie models in rodents. The brain's distribution of neuronal GABAergic subpopulations has been carefully monitored using, as markers, antibodies against the calcium binding proteins parvalbumin and calbindin D-28K. By means of affinity histochemistry with *Wysteria floribunda* agglutinin, the distribution of this perineuronal net marker has been then evaluated. These techniques were performed on the brains of nine scrapie-positive sheep and on four infection-free sheep. These animals had previously undergone a clinical follow-up as well as a lesion profile and an immunohistochemical profile of the scrapie-associated prion protein deposition patterns in the brain. The study of calcium-binding proteins revealed an alteration of the parvalbumin positive GABAergic neuronal subpopulation. In scrapie-positive cases, a reduction in stained neuronal perykaria was observed, along with a marked reduction of neurite labelling. This finding was noticeable in regions such as the neocortex, particularly the motor frontal cortex, and was concomitant with a moderate PrPsc deposition and a mild degree of lesion. No changes were observed in the extracellular matrix study. Results of the present study provide a partial explanation for the mechanisms of scrapie clinical signs due to a disturbance of the parvalbumin-positive inhibitory neuronal population.

Keywords: scrapie / GABA / calbindin / parvalbumin / extracellular matrix

1. Introduction

Scrapie belongs to the group of transmissible spongiform encephalopathies (also known as TSEs or prion diseases) of small ruminants (sheep and goats). Clinical signs include ataxia, head tremors, pruritus, altered mental status and other signs such as teeth grinding, paresis, low head carriage, positive nibble response and poor body condition (Healy et al., 2003; Houston and Gravenor, 2003). Amongst these signs, ataxia and head tremors - which seem to have the highest incidence in natural scrapie (Healy et al., 2003) - may partially be explained by a central inhibitory imbalance (Elble, 1996).

Selective neuronal subpopulation vulnerability has been described in certain human prion diseases (Belichenko et al., 1999; Ferrer et al., 1993; Guentchev et al., 1997; Guentchev et al., 1999), and scrapie experimental models in rodents (Bouzamondo et al., 2000; Guentchev et al., 1998; Lu et al., 1995) affecting GABAergic inhibitory neural subsets. γ -Aminobutyric Acid (GABA) is a

major inhibitory neurotransmitter in the central nervous system (CNS) (Roberts, 1986). Parvalbumin and Calbindin D-28K are calcium-binding proteins (CBPs) mainly expressed in inhibitory GABAergic interneurons, and antibodies against both proteins have been extensively used to detect these subsets of GABAergic neuronal populations by immunohistochemistry (Andressen et al., 1993; Celio, 1990; Polgar and Antal, 1995; Webster et al., 1990).

In certain cases, loss of a given subpopulation of neurons has been associated to disturbances of the perineuronal nets embedding such neurons (Belichenko et al., 1999; Guentchev et al., 1999). This might be due to an activation of microglia that releases proteases possibly responsible for the destruction of perineuronal nets (Belichenko et al., 1999), as occurs with microglia activation in HIV-induced neuropathy. However more recent reports on experimental TSE models suggest that involvement of the GABAergic pathways exists, but does not show selective vulnerability, being affected instead in a similar manner to other pathways (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004).

Agglutinin from *Wysteria Floribunda* (WFA) is a lectin that binds to N-acteil galactosamide glucidic residues forming certain glucosaminoglycans in the brain's extracellular matrix proteoglycans. It is thus a marker for perineuronal nets. It has been demonstrated in rodents that WFA has an area-specific distribution within the brain (Bruckner et al., 1994) and this has been related to GABAergic neural populations (Hartig et al., 1992) as well as to glutamatergic populations, particularly those inhibited by the gabaergic, thus rich in GABA receptors (Wegner et al., 2003).

Our aim in the present study firstly was to examine the pathological stage of 9 scrapie affected animals at an advanced clinical stage of the disease, by means of the lesion profile, PrPsc distribution and

immunostaining profile. The second objective was to describe the distribution of CBPs, as markers of the GABAergic population, and that of the WFA-positive perineuronal nets in normal adult sheep brains. The next step was to compare these to scrapie-affected sheep brains and determine if the changes observed could be related to the pathological findings detected in the first part of the study. Finally, we will discuss whether this might somehow explain the clinical signs recorded before culling. This is a descriptive study with which we intend to outline the involvement of CBPs and perineuronal nets in ovine scrapie, field-case pathogenesis, a matter that has been widely studied in several human and animal TSE models with rather controversial results.

Number	Case	Age (years)	Genotype	Sex	Breed	Outbreak	3rd eyelid biopsy	Postmortem delay
O-73/02	SC 1	6	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	1	Positive	30 min
O-86/02	SC 2	3	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	2	NA	24 h
O-138/03	SC 3	5	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	4	Positive	10 min
O-139/03	SC 4	5	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	5	Positive	10 min
O-248/03	SC 5	7	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	1	Negative	10 min
O-107/03	SC 6	Adult	ARQ/ARQ	F	Roya Bilbilitana	1	Inconclusive	30 min
O-85/02	SC 7	4	ARQ/ARQ	M	Rasa Aragonesa	1	Positive	1 h
O-120/03	SC 8	5	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	3	NA	10 min
O-122/03	SC 9	Adult	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	3	NA	10 min
O-442/04	CT 1	4	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	---	---	10 min
O-441/04	CT 2	3	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	---	---	10 min
O-439/04	CT 3	5	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	---	---	10 min
O-438/04	CT 4	4	ARQ/ARQ	F	Rasa Aragonesa	---	---	10 min

Table I: Details of the animals included in the study. Abbreviations: SC (scrapie), CT (control), F (female), M (male), NA (not analysed), h (hour) and m (minute).

2. Materials and methods

2.1. Animals and general procedures

Two groups of animals were included in the present study: adult control animals (n=4) and scrapie-affected animals (n=9). Details on the breed, age, sex and genotype for codons 136, 154 and 171 are provided in Table I. All scrapie cases were animals diagnosed within the framework of the National TSE Surveillance programme at the Spanish National Reference Centre for TSE diagnostics. Scrapie status was determined *in vivo* by means of neurological examination and/or third eyelid

biopsy. The animals originated from five different outbreaks of scrapie, detected either through active or passive surveillance programmes. Further flock screening allowed identification and clinical examination of other concomitant scrapie cases within the scrapie-positive flocks. Only clinically examined animals were included in this study.

After necropsy, the brains were immersed in 10% phosphate-buffered formalin for 10 days. After fixation, 4 mm-thick tissue sections were blocked and immersed in 98% formic acid for 1h to reduce prion infectivity. Tissues were then dehydrated through increasing concentrations of alcohol and embedded in paraffin wax. 4 micrometer sections

were then obtained and routinely stained with hematoxylin and eosin to evaluate morphological change. Further sections were then cut and mounted on triethoxysilyl propylamin-treated glass slides for immunohistochemical and histochemical procedures.

The brain areas dissected for study were the following: piriform cortex (Pfc), hippocampus (H), occipital cortex (Oc), temporal cortex (Tc), parietal cortex (Pc), frontal cortex (Fc), striatum (S), thalamus (T), mesencephalon (M), pons (P), medulla oblongata (Mobl), spinal cord (Sc), cerebellar medulla (Cm), cerebellar hemispheres (Cc) and cerebellar vermis (Cv).

2.2. Immunohistochemistry

PrPsc immunohistochemistry was performed as previously described (Monleon et al., 2004). Briefly, the following pre-treatments were applied: immersion in formic acid for 15 min, proteinase K treatment for 15 min at 37°C (Roche, Switzerland; 4 µg/ml) and hydrated autoclaving. Monoclonal antibody L42 (R-Biopharm, Germany; 1 in 500 for 30 min) as the primary antibody, EnVision™ (DAKO, Denmark) as the visualization system and 3,3' diaminobenzidine (DAB) as chromogen were used.

The protocols for the remaining primary antibodies used heat-induced epitope retrieval pretreatment with citrate buffer (pH6.0); antibody binding was visualized with the Avidin Peroxidase-Biotin Complex (Pierce) for the MAb Calbindin D-28k (CALB, 1 in 800, Sigma) and MAb Parvalbumin (PV, 1 in 600, Sigma).

2.3. Semiquantification and data analysis

Semiquantification of the different parameters studied (immunolabelling -IL- patterns and histopathological lesions) was carried out. Scores from 0 (absence of lesion or IL pattern) to 5 (maximum intensity of lesion or IL patterns) were assigned to each brain area studied and profiles were drawn. The PrPsc IL patterns identified were classified taking into account the description outlined by Gonzalez and collaborators with scrapie-affected sheep (Gonzalez et al., 2002). From the 12 types of IL patterns described by this group 8 have been selected for this profiling study: intraneuronal, perineuronal, stellate, linear, fine punctate, coarse particulate, coalescing and plaques.

Each area was studied as a global region for the score.

For all parameters, results are plotted as a function of the anatomical area. Areas are ordered in the X axis in an attempt to represent the caudorostral axis of the brain. This methodology was adapted from a previous study carried out on BSE-infected cattle in our laboratory (Vidal et al., 2005).

Origin 7.0 software was used for data analysis.

2.4. Affinity histochemistry

Histochemistry using *Wysteria floribunda* Biotinylated Agglutinin (WFA, Vector), which binds to N-Acetylglactosamide, a sugar residue attached to proteoglycans composing the brain's perineuronal nets, was performed to evaluate the status of the extracellular matrix. Endogenous peroxidase activity was blocked on deparaffinised sections and these were incubated overnight with the lectins. The washing buffer was supplemented with CaCl₂, MgCl₂·6H₂O and MnCl₂·4H₂O 1 mM. Finally, the binding was carried out with the Avidin-Peroxidase Biotin Complex (Pierce) and developed with 3,3' diaminobenzidine.

2.5. Double labelling

Double labelling with MAb PV and WFA was carried out following a two-step protocol. The sections were processed for MAb PV signalling as previously described, the reaction being visualized with DAB. After washing, the sections were incubated with the biotinylated lectin WFA and the reaction was developed with 0.10% benzidine dihydrochloride and 0.025% sodium nitroferricyanide in 0.001M Phosphate buffer (pH6) and 0.005% hydrogen peroxide. The second reaction yielded a granular bluish precipitate different from the diffuse brown staining obtained with DAB.

3. Results

3.1. Clinical signs

The most consistent signs observed in the scrapie-positive sheep included in this study were pruritus (9/9) and wool/skin disturbances (8/9), along with a generalised decrease in the physical condition. Neurological signs were also present: alteration of the motor function was evidenced as tremors (6/9), ataxia (7/9) and recumbency (7/9). In addition, the

mental status was also altered with some animals showing marked hyperexcitability (6/9).

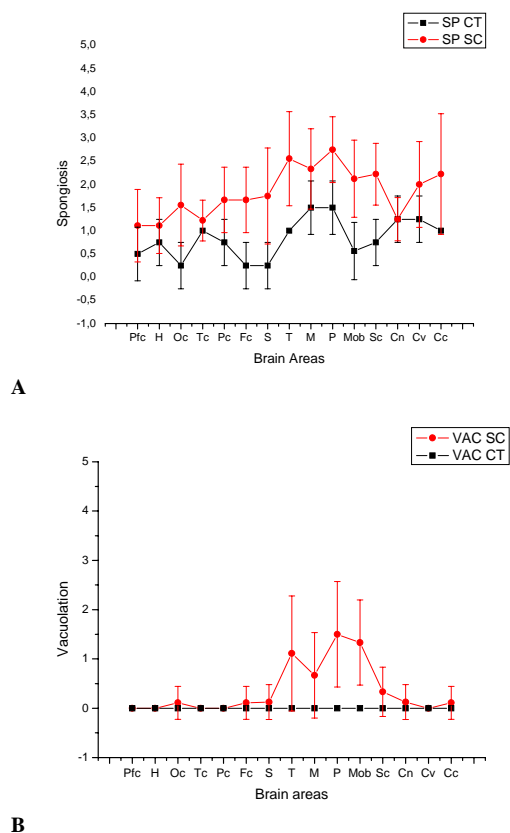


Figure 1: Lesion profiles. Comparison of lesion scores for (A) spongiosis (SP) and (B) intra-neuronal vacuolation (VAC) in each brain area (horizontal axis) in control (CT) and scrapie-affected sheep (SC). The values are the mean of the 9 scrapie-positive animals, the vertical bars represent standard deviation. For brain area abbreviation, see paragraph 3 in Materials and Methods.

3.2. Neuropathological changes

Classical TSE lesions, namely neuropil spongiosis and neuronal vacuolation, were semiquantitatively evaluated (figure 1), as described in the materials and methods section. Lesions were mainly confined to the brain-stem region and the thalamus, the pons being one of the most affected regions. Although particular nuclei in the brainstem, at the obex level, were severely affected such as the vagus nerve dorsal motor nucleus, the trigeminal spinal tract or the solitary tract, as a whole, the pons and the thalamus sections evaluated showed higher lesion scores than the medulla oblongata. Neuronal loss was not evaluated, although some signs of neuronal

death (dark neurons) and degeneration (spheroids, pericarian swelling) were occasionally observed. An increase in the cellularity due to glial activation was also noticed, it was particularly heavier at the brainstem and thalamus. The lesion profile of the positive sheep is in keeping with the classical descriptions of scrapie neuropathology. Mild levels of spongiosis were detected in control animals which were attributed to non disease related causes such as ageing.

3.3. PrPsc immunohistochemistry

Different PrPsc IL patterns, corresponding to various cellular and subcellular locations of protein deposits, were semiquantitatively scored (as described for the lesional profile) in order to obtain the immunolabelling profiles of the scrapie-positive sheep cases included in the study.

As shown in the mean immunolabelling profile for scrapie cases (see figure 2), although certain variability was detected between the different cases, a similar distribution of the PrPsc IL patterns was seen. In some cases, the IL was relatively confined to the brain stem while, in others, PrPsc deposits were widespread throughout the encephalon. A clear tropism of the different IL patterns was seen towards the rhombencephalon, mesencephalon and diencephalon and, in contrast to this, poor tropism towards the telencephalon was noticed, although the paleocortex (represented by the Piriform cortex region in the profiles) also showed a considerable amount of IL for the different patterns, this being less intense in the archicortex (hippocampus) (see Figure 3, G-L). Overall, the most abundant IL patterns were the intra-neuronal and fine punctate, followed by the coarse granular. Interestingly, the glial-associated stellate pattern was negligible in the hippocampus, while being considerable in the brain stem and cerebellar structures. Plaques were observed mainly in the thalamus, and the cerebellar cortex and, to some extent, in the hippocampus, while being barely present in the remaining areas. In figure 2 the mean score for plaques is shown. However, plaques were mainly observed in 5 out of the 9 cases examined: markedly in cases SC1, SC3, SC4 (predominantly located in the thalamus, hippocampus and cerebellar structures) and also in cases SC2 and SC7 (more confined to the hippocampus), the rest only showed a small amount of plaques located in the cerebellar cortex (Figure 4). The distribution of the rest of immunolabelling patterns was more even amongst the different cases. None of the control animals showed any of the cited IL patterns in any brain area.

, A and C). Only a few scattered neurones were stained in the striated body, the piriform lobe (paleocortex) and the hippocampus (archicortex). A particular nucleus, the thalamus reticular nucleus, revealed all of its neurones as immunolabelled, in addition to showing strong neuropil staining (Figure 5, E). In the remaining brainstem, other nuclei showed moderate-to-high numbers of stained pericaria with relevant areas of intense staining such as the mesencephalons coliculi. The substantia

gelatinosa in the spinal cord was also heavily stained. In the cerebellum, strong staining of the Purkinje-cell bodies and prolongations was seen similar to, but not as strong as, that described for the CALB IL. In the molecular layer, basket-cell prolongations were also immunolabelled, as were stellate cells.

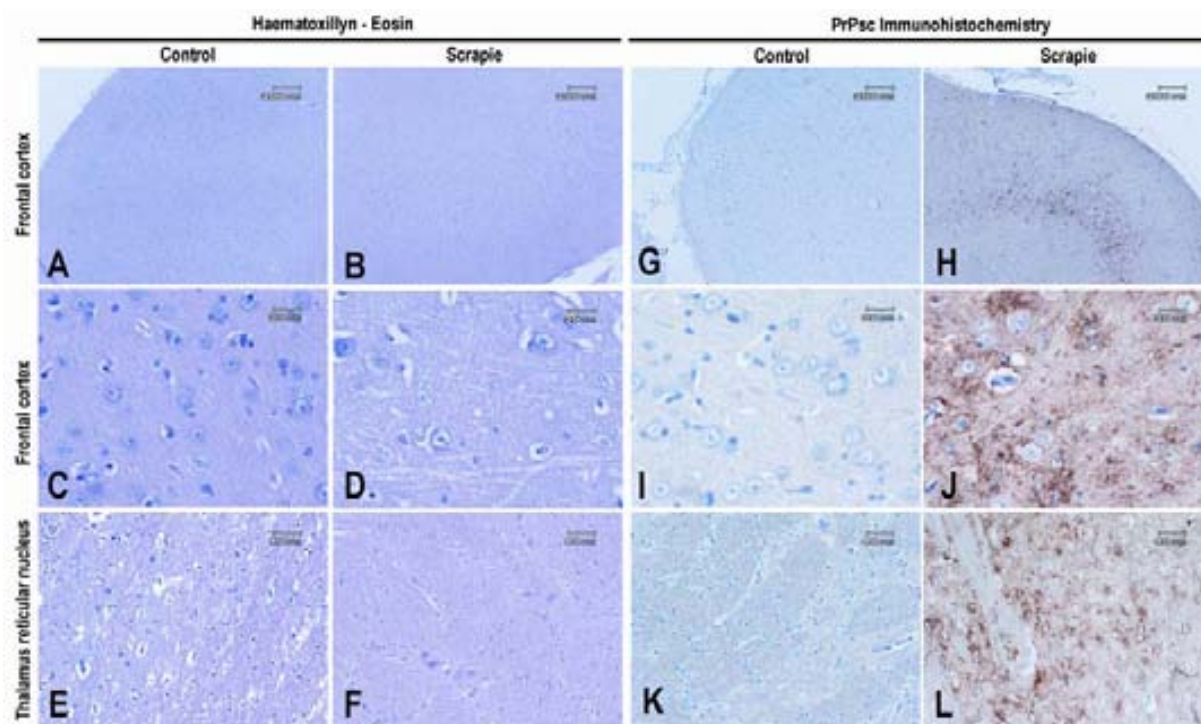


Figure 3: Haematoxylin- Eosin staining (A-F) and immunohistochemistry against PrPsc (L42 1:500, G-L) of control (A, C, E, G, I, K) and Scrapie (B, D, F, H, J, L) affected animals. Several IL-patterns can be identified such as stellate, fine punctate and coarse particulate (J and L), despite only mild spongiosis being present (D and F).

The neuropil and neuronal body IL-patterns were semiquantitatively assessed. When control animals were compared to scrapie-affected cases, differences in IL were noticed (Figure 5). The most striking of these was observed at the neocortex, particularly the frontal, occipital and parietal lobes (see Figure 6). A reduction in the number of stained pericaria was seen, but more significant was the reduction in the neuropile and neurite IL. Other areas with a similar reduction of staining were Ammon's horn, the hippocampus and the thalamus reticular nucleus. Comparatively, the remaining brain areas showed no significant differences with the control animals.

3.5. *Wysteria Floribunda Agglutinin affinity histochemistry*

In control ovine encephalon, WFA labelling was seen throughout the brain. The staining consisted of a strong perineuronal pattern, also following the neurites, which percolated in the surrounding neuropil with varying intensities, depending on the area.

In the neocortex (figure 7 A, B, and E), staining was seen around a high number of neurones in layers III and V, as well as around a few neurones in layers IV and VI; however, almost no staining was

It is worth mentioning that in the neocortex, where the fine punctate and intraneuronal IL patterns predominated noticeably over the rest of the patterns, both were distributed mainly in the

deeper cortical layers, particularly the IV and V (figure 3,H).

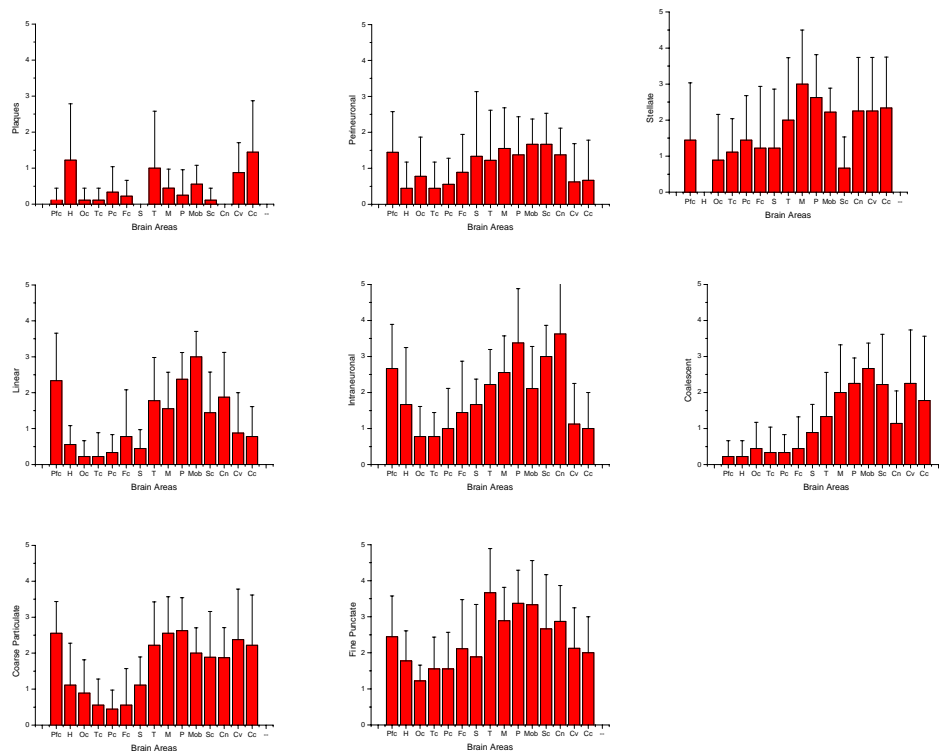


Figure 2: PrPsc immunolabelling pattern profiles. Comparison of the scores obtained for each IL-Patterns in the different brain areas studied (represented in the horizontal axis). Note the tropism of the different patterns towards certain areas, mainly to the brain stem and cerebellum, but also for other areas such as the piriform lobe. The values are the mean of the 9 scrapie-positive animals, the vertical bars represent standard deviation. For brain area abbreviation, see paragraph 3 in Materials and Methods.

3.4. CBPs immunohistochemistry

3.4.1. Calbindin D-28K immunoreactivity

In normal ovine brains, CALB IL was only observed in the cerebellum, strongly staining the Purkinje-cell pericaria and neurites as well as basket-cell prolongations. Neurons in the deep cerebellar nuclei showed perineuronal staining with a synaptic-like pattern. The nuclei neuropile also showed a granular/linear staining pattern due to the positive neurites, probably Purkinje-cell axons. Finally, staining of neuronal bodies in the olivary nucleus in the medulla oblongata was also observed.

When comparing control with scrapie-affected animals, no significant differences were noticed.

3.4.2. Parvalbumin immunoreactivity

In normal ovine brains, PV IL was demonstrated throughout the brain, albeit with a different distribution and intensity depending on the region. Staining in the neocortex was notably constant in the different cerebral lobes, except for the temporal lobe, which showed a less intense staining. IL was observed within the non-pyramidal neuronal pericaria and neurites in the deeper layers of the cortex; layers IV and V were those having the highest numbers of stained neuronal bodies, but some stained bodies were seen also in layers III and VI. A neuropil-pattern staining of neurites was also observed (maximum intensity in layers IV and V), as was perineuronal synaptic-like staining (Figure 5

detected in layers I and II. Neuropil staining was also present at these levels, but was particularly intense in layer V of 3 circumvolutions in the parietal lobe (figure 7 B), namely, the marginal, ectomarginal and suprasylvian circumvolutions. In the brain stem, a strong perineuronal labelling in the Thalamus Reticular nucleus was observed (when compared to other nuclei in the diencephalon). The mesencephalon (figure 7 C and D), pons, medulla oblongata, spinal cord and deep-cerebellar nuclei were intensely stained. Particularly, the grey-matter neuropil staining was very intense in these regions. Neurons in the

reticular formation showed a heavier perineuronal staining than that of other nuclei. The cerebellar vermis and hemispheres showed perineuronal staining of the Golgi cells at the granular layer.

When compared to scrapie brains, no significant differences were noticed. Moreover, even those neurons with evident spongiform degeneration maintained their perineuronal staining intact (figure 7 D).

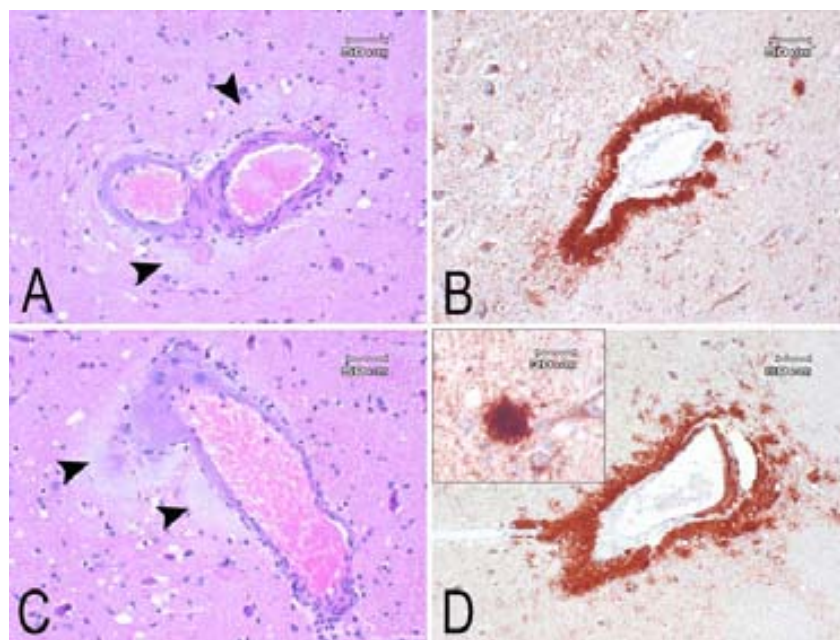


Figure 4: Plaques in the thalamus of the brain of scrapie case SC 3. Haematoxylin and eosin stain (A and C) reveals hyaline, radiating deposits surrounding blood vessels. These deposits are positively stained by an anti-PrPsc monoclonal antibody (L42 1:500) (B and D). Sometimes round-shaped isolated plaques are observed in the neuropil (inset in D).

3.6. PV and WFA double labelling

To ascertain that a selective loss of perineuronal nets in PV+ neurones was not being under-reported, double-labelling of some of the most affected regions was performed (parallel to healthy control sections). It was also deemed of interest to investigate whether the similar distribution showed by the labelling of both PV and WFA was actually due to colocalisation of both markers.

A high number of PV+ neurones showed presence of WFA-labelled perineuronal nets; the alternative situation, i.e. PV+ WFA-negative, was also noticed but at a lower proportion. Instead, a considerable number of WFA+ neurones without PV IL were detected (see Figure 7, F). In the diencephalon, we observed colocalisation of both markers in the thalamus reticular nucleus. It can therefore be concluded that WFA labels an important proportion (though not 100%) of perineuronal nets in the PV+ subpopulation of GABAergic neurones within the ovine brain, and also that it is not an exclusive marker for such a population, since PV negative soma are seen with clear WFA+ perineuronal-net staining.

The proportions of PV+ WFA+ labelled neurons were similar in scrapie and healthy animals in the

different regions evaluated (i.e. frontal, parietal and occipital cerebral lobes and thalamus).

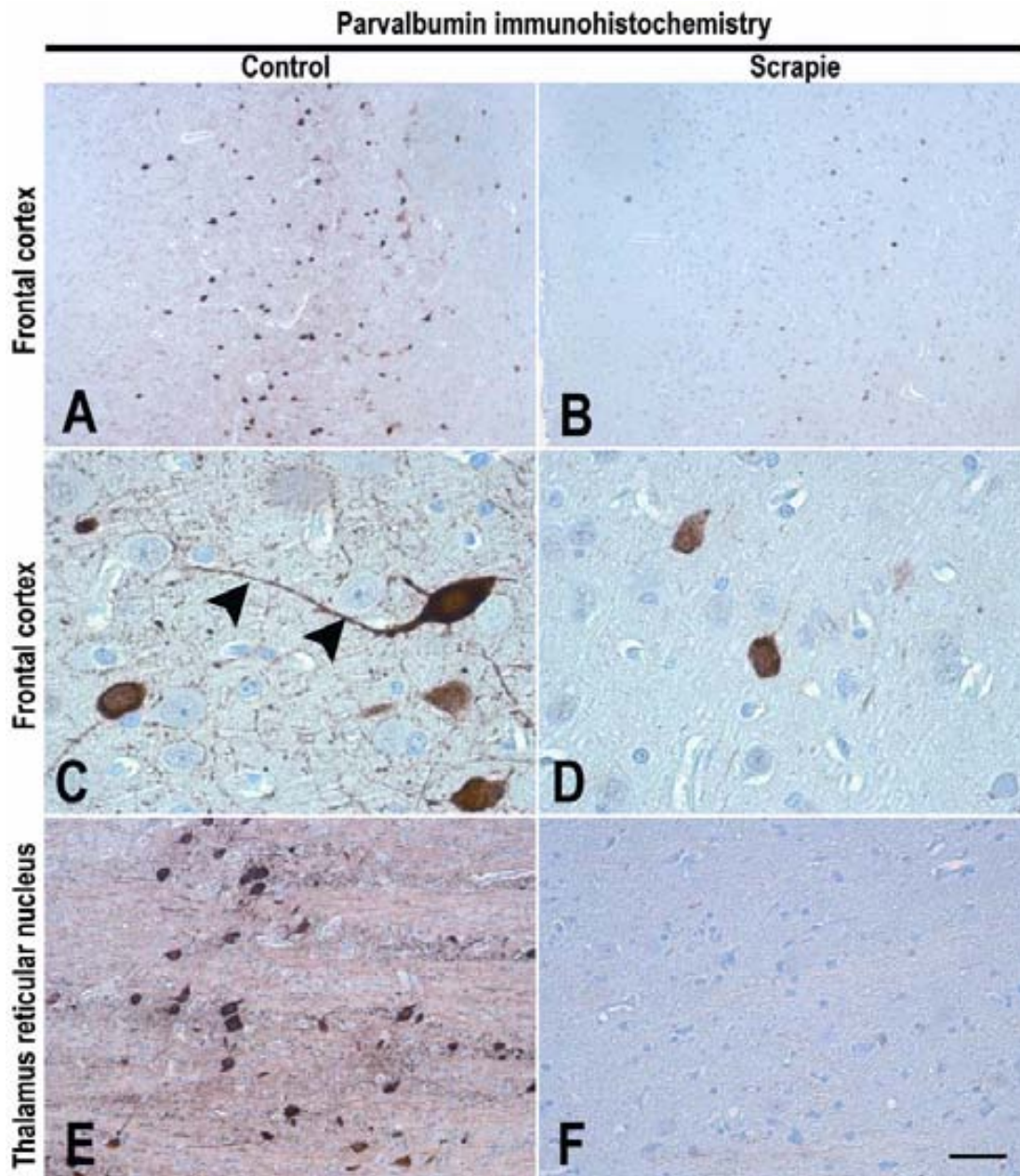


Figure 5: Parvalbumin immunoreactivity in control (A, C, E) and scrapie cases (B, D, F). Note the reduction in stained neuronal bodies and neuropil in scrapie brains. In control brains (C), the neurites are nicely depicted by PV positivity (arrowheads), while this labelling is practically absent in scrapie cases. A and B: Bar 100µm; C and D: Bar 25 µm; E and F: Bar 50µm.

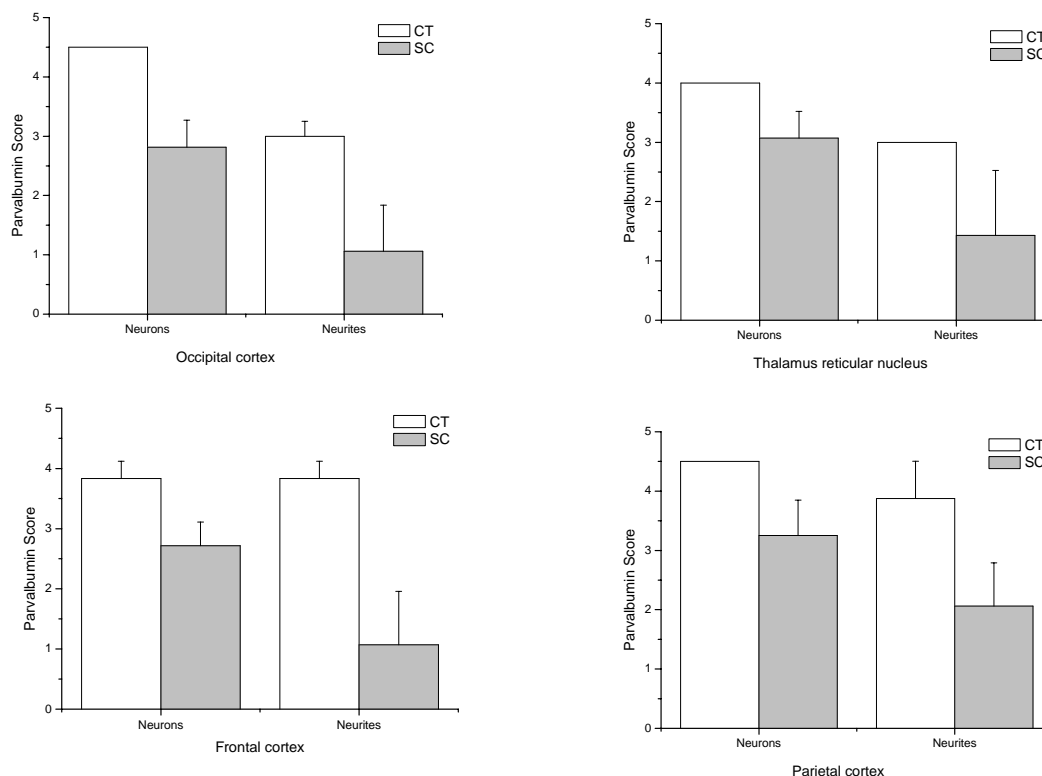


Figure 6: Mean semiquantitative scoring of the PV IL (from 0: absence of IL to 5: maximum IL intensity) of both pericarya and neurites was significantly reduced in scrapie affected animals (SC) in certain areas when compared to control animals (CT). Bars: standard deviation within each group.

4. Discussion

Neuropathological changes and immunohistochemistry patterns described in the present study are in accordance with previous descriptions of scrapie neuropathology (Foster et al., 1996; Fraser, 1976; Hardt et al., 2000; Miller et al., 1993; Ryder et al., 2001; van Keulen et al., 1995; Wood et al., 1997). The study of TSEs has frequently been focused on the obex region. More recently, however, a number of studies have appeared that take into account other regions of the CNS (Bolea et al., 2005; Gonzalez et al., 2003; Ligios et al., 2002) and even peripheral tissues (Andreoletti et al., 2002; Andreoletti et al., 2004; Monleon et al., 2004). We studied the whole brain of 9 scrapie cases. The semiquantitative approach and the profiling methodology described in this study was adapted from a previous study performed in our lab on BSE-affected cattle (Vidal et al., 2005). We believe that this approach facilitates a straightforward interpretation of the results and that the method is reproducible in different laboratories.

We do not attempt to use the profiles described here as a tool to discriminate between TSE strains, but rather as a method to readily interpret results. However, if such analysis were performed on certain recently described TSE strains, such as the NOR98-type scrapie cases, differences would be observed in both the histopathological and immunohistochemical profiles as a deviation of the curve to the right, that is, showing higher values for both lesion and PrPsc deposition in the cerebellar region (Benestad et al., 2003; Buschmann et al., 2004).

PrPsc deposits were spotted in virtually all regions of the brain in the 9 cases, but a similar tropism towards the brain stem is still observed for the majority of PrPsc IL patterns, when we analyze them separately (Figure 2). The tropism towards the brain stem described above is in keeping with the neuroinvasion model described in sheep by which the PrPsc would enter the CNS through the caudal brain stem (through vagal afferents), and then spread further within the brain (Ryder et al., 2001; van Keulen et al., 2002). A previous PrPsc distribution study performed with rapid tests, also on

Rasa Aragonesa Sheep, showed that the brain stem bore the bulk of PrPsc deposition (Bolea et al., 2005).

Individual variability can be explained by different factors, namely host breed, prnp genotype, dose and route of infection, age at time of infection, duration of clinical signs and presumably by the so called “strain” causing the disease (Fraser, 1993). High individual variability has been reported before in natural scrapie infections (Begara-McGorum et al., 2002; Gonzalez et al., 2002). The animals included in this study belong to the Spanish *Rasa Aragonesa* breed (except for one, which belongs to the *Roya Bilbilitana* breed (table 1)). As regards the prnp

allele, all belong to the same genotype: ARQ-homozygous, being the most common genotype for the *Rasa Aragonesa* breed (Acin et al., 2004). The presence of different strains, or combinations of these, cannot be excluded since the animals come from five different scrapie outbreaks, although the outbreaks were diagnosed in the same area. Another shortcoming in this study is that the dose, route, duration and time of the infection are factors that cannot be controlled, since these are all field cases. In terms of the clinical status, all animals were at fairly advanced stages of the disease, some even being recumbent (7/9) at the time of culling.

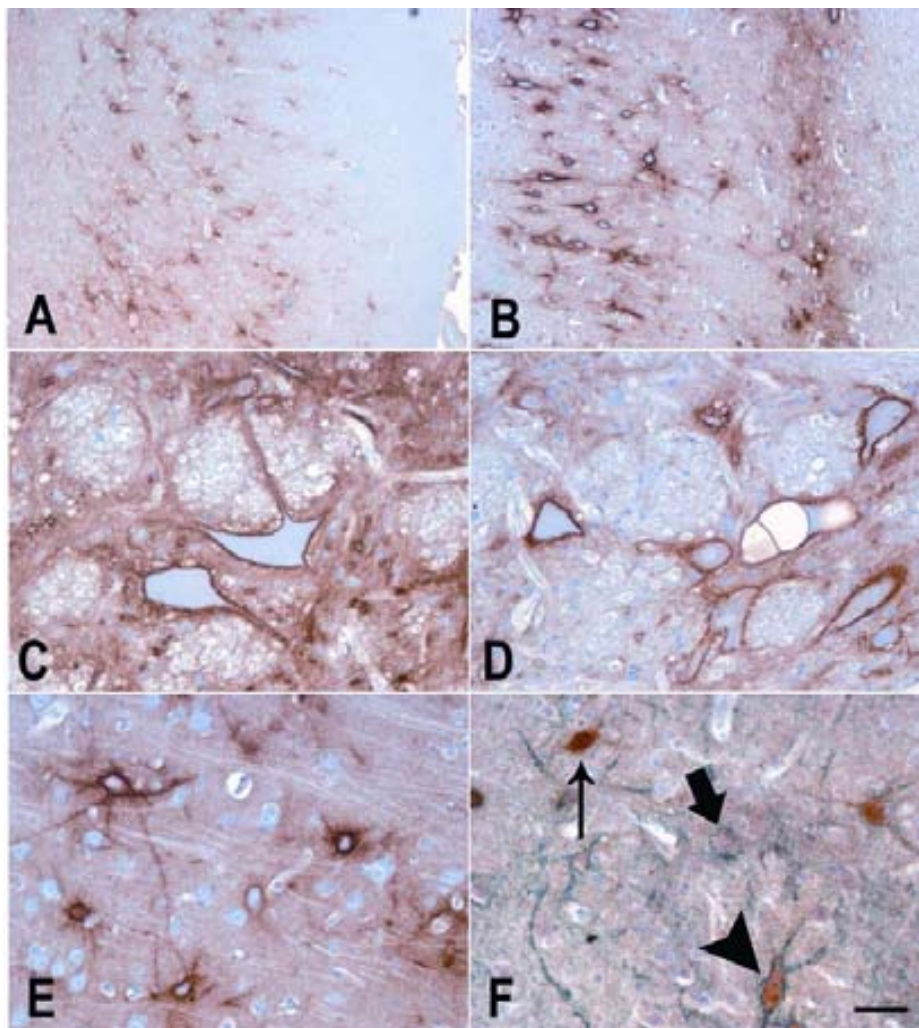


Figure 7: *Wysteria floribunda* agglutinin (WFA) staining (A-E) in frontal cortex (A and E), Parietal cortex (B) and mesencephalon (C and D). Double-labelling with WFA (blue) and Parvalbumin (brown) in frontal cortex (F). Note preserved perineuronal staining even in vacuolated neurons in scrapie-affected brain stem sections (D). Double labelling shows that most PV+ neurons have WFA perineuronal staining (arrowhead), although a few scattered PV+ neurons do not (thin arrow). PV negative neurons with WFA perineuronal staining are also frequent (bold arrow). A: Bar 200µm, B: Bar 100µm and C-F: Bar 50µm.

Despite the heterogeneity described above, the histopathological and immunohistochemical changes coincide, generally speaking, with classical scrapie descriptions. The present is the first publication to include PrPsc immunohistochemical profiling of the brains of scrapie affected sheep of the *Rasa Aragonesa* breed. It is interesting to highlight the presence of PrPsc positive plaques in these sheep, in contrast to what has been described with other breeds bearing the ARQ-ARQ prnp genotype, such as the Suffolk (Gonzalez et al., 2002); although earlier reports on Suffolk sheep do describe the presence of such IL pattern (Jeffrey et al., 1998). Other studies have also described absence of plaques in ARQ-ARQ sheep breeds (Ligios et al., 2004). The prnp genotype of the host sheep does exert notable influence on the susceptibility to scrapie infection and also on the PrPsc deposition profile (Ligios et al., 2004). However some authors argue that the PrPsc profile is strongly related to the infectious agent strain (Gonzalez et al., 2002; Martin et al., 2005) and, finally, one cannot discard other factors such as the host breed. This seems to be our case, since the animals with more plaques belonged to different outbreaks, except cases SC3 and SC7 which belonged the same one (see Table 1).

Since our objective was to disclose common pathogenetic events in natural scrapie, regarding calcium binding proteins and extracellular matrix, only evident changes present in all the scrapie cases included have been taken into consideration.

Few descriptions of the ovine adult brain distribution of CBPs as markers for subsets of the GABAergic neuronal population have been published before (McDonald et al., 1995; Oswald et al., 2001). These authors report a widespread distribution of Calbindin D28K in the brain of both neonatal and adult sheep. In our case, Calbindin D28K IR has only been demonstrated in the cerebellum, deep cerebellar nuclei and medulla oblongata. We obtained a similar result in a previous study performed on canine brains (Siso et al., 2003); however, this was not the case with feline brains (Alcantara and Ferrer, 1995; Vidal et al., 2004) or with other species such as rodents, non-human primates or humans (Ferrer et al., 1992; Van Brederode et al., 1990; Webster et al., 1990). An explanation of why the areas outside the cerebellum show no CALB IL, in our case, could lie with the sample processing method, since most studies published have performed immunohistochemistry against CALB in frozen

tissue, whereas in our study we work with formalin-fixed, formic acid inactivated, paraffin-embedded tissue.

Again, few references were found describing PV IL in adult ovine brains (Oswald et al., 2001), in this paper, we report the normal distribution of PV immunolabelled neurons in the whole brain for 4 control animals.

When comparing the CBP status between control and scrapie animals, we have not detected any evident change in CALB IL, but some significant change in the PV labelling was observed. An apparent reduction of PV+ pericaria is reported accompanied by a significant reduction of the neurite staining in certain brain regions (frontal, occipital and parietal cortical lobes, Ammon's horn in the hippocampus and the thalamus reticular nucleus (TRN)).

These regions were affected by a mild degree of spongiosis (scores between 1-2) and PrPsc deposition was present throughout, the fine punctate being the most predominant IL pattern. This was followed by the intraneuronal and stellate patterns in the case of the cortical lobes and by the coarse particulate and intraneuronal in the case of the TRN. Fine punctate and coarse particulate PrPsc IHC IL patterns correspond to neurite membrane PrPsc aggregates according to ultrastructural studies done in scrapie infected mice (Jeffrey et al., 1994). It is thus tempting to think that neurites of PV+ cortical neurons are susceptible to deposition of PrPsc aggregates in ovine scrapie. Actually, dendritic spine loss has been clearly identified early in the pathogenesis of murine scrapie (Brown et al., 2001; Jeffrey et al., 2000). Also the similar distribution shown by PrPsc intraneuronal IL and PV IL in the deep neocortical layers supports the hypothesis that this neural subpopulation is selectively affected by PrPsc deposits: double IL techniques should be conducted to verify that both markers are staining the same neural population. Findings similar to ours have previously been described in the context of human prion diseases (Ferrer et al., 1993; Guentchev et al., 1997; Guentchev et al., 1999) and experimental scrapie models (Guentchev et al., 1998). Indeed, a recent report on intracerebrally scrapie-challenged hamsters indicate that presynaptic buttons in GABAergic neurons are altered (Bouzamondo-Bernstein et al., 2004). However, no loss of PV+ or GABA+ neurons was observed in this model. A very short incubation period (60 to 70 days post inoculation) and an inoculation route far too

different from the natural, which is supposedly oral, makes it difficult to compare results from this model to natural occurring cases.

To our knowledge, this description is the first to contemplate distribution in the adult ovine brain of the WFA labelling. This lectin has permitted the evaluation of the perineuronal nets of certain brain regions; a close relationship has been reported between the population labelled by WFA and those labelled by PV in that the majority of PV+ neurones showed a WFA-labelled perineuronal net. Although an evident morphological change has been detected in PV+ neurons in certain areas, it has not been possible to correlate such change with a disturbance of the perineuronal nets associated to them. In fact, even neuronal bodies showing evident spongiform change seem to maintain the WFA labelling pattern of their perineuronal nets. These results are in contrast with those from similar studies conducted in CJD affected human brains (Belichenko et al., 1999) and in a murine scrapie model (Ferrer et al., 1993; Guentchev et al., 1997; Guentchev et al., 1999). In those studies, an early destruction of the perineuronal nets is suggested to be one of the first steps leading to neurodegeneration. Since the markers used in those studies are either the same as the one used here (WFA) or Isolectin B₄ (from *Vicia villosa*) a lectin that binds to the same sugars as does WFA, it might be hypothesized that perineuronal nets disruption is not a key feature in our sheep scrapie, field-case pathogenesis.

In conclusion, in scrapie-affected ovine brains, a reduction has been described in the number of pericaria and neurite staining by PV in certain regions related to the presence of mild spongiform change, evident deposition of PrP^{Sc} but no apparent change in the perineuronal nets, as stained by the WFA.

The fact that the perineuronal nets are preserved suggests that the reduction of parvalbumin signalling is due to a down regulation of parvalbumin expression rather than a loss of this neural subpopulation. In murine scrapie models, perineuronal net disruption is closely associated to gliosis (own observation), in this study gliosis has been assessed morphologically and, is rather mild at the regions where changes in parvalbumin changes have been described.

The neurological signs described in this study, typically associated to scrapie, could partially be justified with our findings in that the alteration of

GABAergic neurites may have caused an inhibitory imbalance in areas related to motor function (frontal cortex), and other areas related to mental state (TRN, hippocampus). Thus, signs such as tremors or hyperexcitability might be explained. However, involvement of other pathways cannot be excluded, since signs such as the ataxia mainly reflect an involvement of cerebellar structures, which showed no changes in their GABA population in the present study.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the excellent technical support provided by Sierra Espinar and Anna Maria Llorens of the Priocat Laboratory, CReSA and that of Silvia Ruíz, Nuria Segovia and Santiago Becerra from the National Reference Centre for TSE diagnostic (CNREETs) at the University of Zaragoza. The present study was possible thanks to the financial support of the *Departament de Salut*, the *Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca* of the Catalan Government (*Generalitat de Catalunya*), the Aragón Government and the Network of Excellence for Prion Diseases (Animal Tissues Bank). It was also partially financed by project ET2002-05168-C04-01 of the Spanish *Ministerio de Ciencia y Tecnología* (MCyT).

References

- Acin, C., Martin-Burriel, I., Goldmann, W., Lyahyai, J., Monzon, M., Bolea, R., Smith, A., Rodellar, C., Badiola, J.J. and Zaragoza, P., 2004. Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. *J Gen Virol* 85, 2103-10.
- Alcantara, S. and Ferrer, I., 1995. Postnatal development of calbindin-D28k immunoreactivity in the cerebral cortex of the cat. *Anat Embryol (Berl)* 192, 369-84.
- Andreoletti, O., Berthon, P., Levavasseur, E., Marc, D., Lantier, F., Monks, E., Elsen, J.M. and Schelcher, F., 2002. Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 50, 1357-70.
- Andreoletti, O., Simon, S., Lacroux, C., Morel, N., Tabouret, G., Chabert, A., Lugan, S., Corbiere, F., Ferre, P., Foucras, G., Laude, H., Eychenne, F., Grassi, J. and Schelcher, F., 2004. PrP^{Sc} accumulation in myocytes from sheep incubating natural scrapie. *Nat Med* 10, 591-3.
- Andressen, C., Blumcke, I. and Celio, M.R., 1993. Calcium-binding proteins: selective markers of nerve cells. *Cell Tissue Res* 271, 181-208.
- Begara-McGorum, I., Gonzalez, L., Simmons, M., Hunter, N., Houston, F. and Jeffrey, M., 2002. Vacuolar lesion profile in sheep scrapie: factors influencing its variation and relationship to disease-specific PrP accumulation. *J Comp Pathol* 127, 59-68.
- Belichenko, P.V., Miklossy, J., Belser, B., Budka, H. and Celio, M.R., 1999. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis* 6, 269-79.
- Benestad, S.L., Sarradin, P., Thu, B., Schonheit, J., Tranulis, M.A. and Bratberg, B., 2003. Cases of scrapie with

- unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec* 153, 202-8.
- Bolea, R., Monleon, E., Schiller, I., Raeber, A.J., Acin, C., Monzon, M., Martin-Burriel, I., Struckmeyer, T., Oesch, B. and Badiola, J.J., 2005. Comparison of immunohistochemistry and two rapid tests for detection of abnormal prion protein in different brain regions of sheep with typical scrapie. *J Vet Diagn Invest* 17, 467-9.
- Bouzamondo-Bernstein, E., Hopkins, S.D., Spilman, P., Uyehara-Lock, J., Deering, C., Safar, J., Prusiner, S.B., Ralston, H.J., 3rd and DeArmond, S.J., 2004. The neurodegeneration sequence in prion diseases: evidence from functional, morphological and ultrastructural studies of the GABAergic system. *J Neuropathol Exp Neurol* 63, 882-99.
- Bouzamondo, E., Milroy, A.M., Ralston, H.J., 3rd, Prusiner, S.B. and DeArmond, S.J., 2000. Selective neuronal vulnerability during experimental scrapie infection: insights from an ultrastructural investigation. *Brain Res* 874, 210-5.
- Brown, D., Belichenko, P., Sales, J., Jeffrey, M. and Fraser, J.R., 2001. Early loss of dendritic spines in murine scrapie revealed by confocal analysis. *Neuroreport* 12, 179-83.
- Bruckner, G., Seeger, G., Brauer, K., Hartig, W., Kacza, J. and Bigl, V., 1994. Cortical areas are revealed by distribution patterns of proteoglycan components and parvalbumin in the Mongolian gerbil and rat. *Brain Res* 658, 67-86.
- Buschmann, A., Luhken, G., Schultz, J., Erhardt, G. and Groschup, M.H., 2004. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol* 85, 2727-33.
- Celio, M.R., 1990. Calbindin D-28k and parvalbumin in the rat nervous system. *Neuroscience* 35, 375-475.
- Elble, R.J., 1996. Central mechanisms of tremor. *J Clin Neurophysiol* 13, 133-44.
- Ferrer, I., Casas, R. and Rivera, R., 1993. Parvalbumin-immunoreactive cortical neurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol* 34, 864-6.
- Ferrer, I., Tunon, T., Soriano, E., del Rio, A., Iraizoz, I., Fonseca, M. and Guionnet, N., 1992. Calbindin immunoreactivity in normal human temporal neocortex. *Brain Res* 572, 33-41.
- Foster, J.D., Wilson, M. and Hunter, N., 1996. Immunolocalisation of the prion protein (PrP) in the brains of sheep with scrapie. *Vet Rec* 139, 512-5.
- Fraser, H., 1976. The pathology of a natural and experimental scrapie. *Front Biol* 44, 267-305.
- Fraser, H., 1993. Diversity in the neuropathology of scrapie-like diseases in animals. *Br Med Bull* 49, 792-809.
- Gonzalez, L., Martin, S., Begara-McGorum, I., Hunter, N., Houston, F., Simmons, M. and Jeffrey, M., 2002. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol* 126, 17-29.
- Gonzalez, L., Martin, S. and Jeffrey, M., 2003. Distinct profiles of PrP^d immunoreactivity in the brain of scrapie- and BSE-infected sheep: implications for differential cell targeting and PrP processing. *J Gen Virol* 84, 1339-1350.
- Guentchev, M., Groschup, M.H., Kordek, R., Liberski, P.P. and Budka, H., 1998. Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathol* 8, 615-23.
- Guentchev, M., Hainfellner, J.A., Trabattoni, G.R. and Budka, H., 1997. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 56, 1119-24.
- Guentchev, M., Wanschitz, J., Voigtlander, T., Flicker, H. and Budka, H., 1999. Selective neuronal vulnerability in human prion diseases. Fatal familial insomnia differs from other types of prion diseases. *Am J Pathol* 155, 1453-7.
- Hardt, M., Baron, T. and Groschup, M.H., 2000. A comparative study of immunohistochemical methods for detecting abnormal prion protein with monoclonal and polyclonal antibodies. *J Comp Pathol* 122, 43-53.
- Hartig, W., Brauer, K. and Bruckner, G., 1992. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport* 3, 869-72.
- Healy, A.M., Weavers, E., McElroy, M., Gomez-Parada, M., Collins, J.D., O'Doherty, E., Sweeney, T. and Doherty, M.L., 2003. The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med* 17, 908-16.
- Houston, E.F. and Gravenor, M.B., 2003. Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet Rec* 152, 333-4.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Bruce, M., McBride, P.A., Scott, J.R. and Halliday, W.G., 1994. Correlative light and electron microscopy studies of PrP localisation in 87V scrapie. *Brain Res* 656, 329-43.
- Jeffrey, M., Goodsir, C.M., Holliman, A., Higgins, R.J., Bruce, M.E., McBride, P.A. and Fraser, J.R., 1998. Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec* 142, 534-7.
- Jeffrey, M., Halliday, W.G., Bell, J., Johnston, A.R., MacLeod, N.K., Ingham, C., Sayers, A.R., Brown, D.A. and Fraser, J.R., 2000. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol* 26, 41-54.
- Ligos, C., Dexter, G., Spiropoulos, J., Maestrone, C., Carta, A. and Simmons, M.M., 2004. Distribution of vascular amyloid in scrapie-affected sheep with different genotypes. *J Comp Pathol* 131, 271-6.
- Ligos, C., Jeffrey, M., Ryder, S.J., Bellworthy, S.J. and Simmons, M.M., 2002. Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol* 127, 45-57.
- Lu, P., Sturman, J.A. and Bolton, D.C., 1995. Altered GABA distribution in hamster brain is an early molecular consequence of infection by scrapie prions. *Brain Res* 681, 235-41.
- Martin, S., Gonzalez, L., Chong, A., Houston, F.E., Hunter, N. and Jeffrey, M., 2005. Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol* 86, 839-48.
- McDonald, T.J., Li, C. and Wasserman, R.H., 1995. Distribution of calbindin-D28K in the brain of the fetal sheep in late gestation. *Brain Res* 675, 303-15.
- Miller, J.M., Jenny, A.L., Taylor, W.D., Marsh, R.F., Rubenstein, R. and Race, R.E., 1993. Immunohistochemical detection of prion protein in sheep with scrapie. *J Vet Diagn Invest* 5, 309-16.
- Monleon, E., Monzon, M., Hortells, P., Vargas, A., Acin, C. and Badiola, J.J., 2004. Detection of PrP^{sc} on lymphoid tissues from naturally affected scrapie animals:

- comparison of three visualization systems. *J Histochem Cytochem* 52, 145-51.
- Oswald, M.J., Kay, G.W. and Palmer, D.N., 2001. Changes in GABAergic neuron distribution in situ and in neuron cultures in ovine (OCL6) Batten disease. *Eur J Paediatr Neurol* 5 Suppl A, 135-42.
- Polgar, E. and Antal, M., 1995. The colocalization of parvalbumin and calbindin-D28k with GABA in the subnucleus caudalis of the rat spinal trigeminal nucleus. *Exp Brain Res* 103, 402-8.
- Roberts, E. 1986. GABA: the road to neurotransmitter status. In: R.W. Olsen and J.C. Venter (Eds), *Benzodiazepine/GABA Receptors and Chloride Channels: Structural and Functional Properties*, Alan R. Liss, New York, pp. 1-39.
- Ryder, S.J., Spencer, Y.I., Bellerby, P.J. and 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, 7-13.
- Siso, S., Tort, S., Aparici, C., Perez, L., Vidal, E. and Pumarola, M., 2003. Abnormal neuronal expression of the calcium-binding proteins, parvalbumin and calbindin D-28k, in aged dogs. *J Comp Pathol* 128, 9-14.
- Van Brederode, J.F., Mulligan, K.A. and Hendrickson, A.E., 1990. Calcium-binding proteins as markers for subpopulations of GABAergic neurons in monkey striate cortex. *J Comp Neurol* 298, 1-22.
- van Keulen, L.J., Schreuder, B.E., Meloen, R.H., Poelen-van den Berg, M., Mooij-Harkes, G., Vromans, M.E. and Langeveld, J.P., 1995. Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie. *Vet Pathol* 32, 299-308.
- van Keulen, L.J., Vromans, M.E. and van Zijderveld, F.G., 2002. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apms* 110, 23-32.
- Vidal, E., Márquez, M., Ordoñez, M., Raeber, A., Struckmeyer, T., Oesch, B., Siso, S. and Pumarola, M., 2005. Comparative study of the PrPBSE distribution in brains from BSE field cases using rapid tests. *J Virol Methods* 127, 24-32.
- Vidal, E., Montoliu, P., Anor, S., Siso, S., Ferrer, I. and Pumarola, M., 2004. **A novel spongiform degeneration of the grey matter in the brain of a kitten.** *J Comp Pathol* 131, 98-103.
- Webster, W.R., Batini, C., Buisseret-Delmas, C., Compoint, C., Guegan, M. and Thomasset, M., 1990. Colocalization of calbindin and GABA in medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *Neurosci Lett* 111, 252-7.
- Wegner, F., Hartig, W., Bringmann, A., Grosche, J., Wohlfarth, K., Zuschratter, W. and Bruckner, G., 2003. Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol* 184, 705-14.
- Wood, J.L., McGill, I.S., Done, S.H. and Bradley, R., 1997. Neuropathology of scrapie: a study of the distribution patterns of brain lesions in 222 cases of natural scrapie in sheep, 1982-1991. *Vet Rec* 140, 167-74.

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

“L’ocasió fa el lladre” o, en el meu cas, podríem dir “l’aparició de casos fa la tesi”. Efectivament, ha estat l’accés als encèfals de vaques diagnosticades d’EEB el que ha fet possible el desenvolupament d’aquesta tesi. Més tard, en el decurs del seu desenvolupament vam creure apropiat afegir-hi casos d’una segona malaltia, molt relacionada: la TO.

Per conduir aquest apartat intentarem seguir la línia de pensament que vam desenvolupar en el transcurs dels estudis que presentem. Això genera un ordre de les coses que no es correspon exactament a com han quedat presentades als diferents treballs que conformen la tesi. Intentarem, doncs, situar el lector, en cada moment de la discussió, en quina part dels treballs estem situats.

Amb la finalitat d’assolir el nostre objectiu d’aprofundir en el coneixement de la patogènia de les EET el primer que vam fer, un cop obtingudes les mostres que havíem d’estudiar, va ser caracteritzar-les, saber amb què treballaríem. Sabíem que eren casos positius però ens mancava informació del moment de la malaltia en què es trobaven.

L’aproximació per fer això, i com que formava part d’un grup de neuropatologia, va ser, d’entrada, l’avaluació histopatològica de les mostres. Acceptant que la distribució de lesions en les EET és simètrica i bilateral (4), es destinava la meitat de l’encèfal de cada cas a histopatologia i l’altra meitat es conservava congelada per a estudis bioquímics.

Al treball núm. 3 introduïm la metodologia del perfil. Aquesta forma de treballar no era nova en el camp de la neuropatologia ni en el de les EET (69, 244). Un dels avantatges del mètode del perfil era que ens permetia comparar i analitzar fàcilment les dades obtingudes de l’anàlisi semiquantitativa. Era, en definitiva, una eina per simplificar i sistematitzar l’estudi de l’encèfal, un òrgan d’enorme complexitat anatòmica i funcional.

El perfil que vam dissenyat consistia a col·locar a l’eix horitzontal d’una gràfica les àrees encefàliques que van ser estudiades, ordenades seguint l’eix rostrocaudal de l’encèfal. Evidentment es tractava d’una ordenació artificial que calia interpretar com a tal. És per això que, en ocasions, vam utilitzat un esquema de l’encèfal per presentar els resultats d’una forma més visual. L’eix d’abscisses corresponia als diferents paràmetres estudiats.

Vam definir el perfil lesional dels nostres casos basant-nos en tres de les lesions més característiques de l’EEB: la gliosi, l’espongiosi del neuròpil i la vacuolització neuronal (4). Els resultats obtinguts van ser força homogenis i els podíem resumir de la manera següent: el grau de lesió era força lleu en la majoria de casos i trobàvem que les lesions estaven concentrades, sobretot, al tronc encefàlic.

DISCUSSIÓ

Quan vam analitzar estadísticament les valoracions semiquantitatives vam trobar diferències significatives en els nivells de gliosi i espongiosi entre animals amb EEB i animals sans. Quant a la vacuolització neuronal això no era així a causa de la baixa intensitat de lesió i al fet que en animals sans s'observaven, de forma fisiològica, neurones vacuolitzades, amb una freqüència alta al nucli roig mesencefàlic (245).

D'una forma paral·lela a l'estudi histològic, vam començar a estudiar mitjançant el WB la distribució encefàlica de la proteïna priònica resistent (la PrPres). En aquest punt passem al treball núm. 1.

De seguida vam poder observar que la distribució de la PrPres no era homogènia en tot l'encèfal i que hi havia una variabilitat considerable entre casos diferents. Aquest estudi va generar la BPDC (Brain PrP^{sc} Distribution Curve o corba encefàlica de distribució de la PrP^{sc}), que no és més que el perfil encefàlic de la valoració que hem fet mitjançant WB de la quantitat de PrPres.

Dels resultats d'aquest estudi ens va sorprendre, en primer lloc, que després d'haver comprovat que el grau lesional era relativament lleu, en molt casos es podia detectar dipòsit de PrPres a gairebé totes les àrees encefàliques, fins i tot en àrees on els canvis lesionals eren absents. En segon lloc cridaven l'atenció les diferències entre casos: mentre que en alguns el dipòsit de PrPres afectava tot l'encèfal, en altres es restringia al tronc de l'encèfal. Arribats a aquest punt, volem recordar que tots els casos d'EEB que hem estudiat han estat diagnosticats a partir d'un WB per detectar PrPres a la regió de l'òbex. En els casos atípics la BPDC també seria d'utilitat per interpretar la distribució i, per tant, la difusió de la PrPres dins l'encèfal.

La mitjana de totes les BPDC mostra un pic evident a la medulla oblonga. Per interpretar la forma que adopta la corba ens basem amb el fet que l'entrada de la PrPres a l'encèfal via nerviosa es dona per aquest punt (246, 247). Aquesta distribució suggereix que la PrPres és més abundant allí on fa més temps que s'acumula, prop del tronc de l'encèfal, i menys en regions més allunyades. Així expliquem les diferències entre les corbes dels diferents casos com a diferents moments en l'evolució de la malaltia. Aquest tipus de distribució està ben contrastat en el cas de la TO en ovella i hámsters (93, 130) i consisteix en una major abundància de dipòsit de PrPres a l'alçada del tronc encefàlic i de l'hipocamp enfront a una menor quantitat en altres estructures com el neocòrtex o paleocòrtex.

Durant l'elaboració de les BPDC vam comparar l'eficàcia de dues proves ràpides: l'una basada en la tècnica de la transferència Western (*Western Blotting* -WB- electroforesi i transferència a membrana) i l'altra en un assaig immunosorbent de luminiscència (LIA). Quan ens movíem amb rangs elevats de dipòsit de PrPres el LIA ofería avantatges. El fet d'obtenir una lectura numèrica (en unitats relatives de llum) ens permetia discriminar millor entre valors elevats en els quals el WB se saturava. D'altra banda, en àrees on la quantitat de PrPres era, en general, menor, el WB mostrava una sensibilitat major. Això es podia explicar pel fet que el LIA havia estat posat a punt per

DISCUSSIÓ

detectar PrPres a la regió de l'òbex de manera que possibles diferències degudes a l'àrea encefàlica mostrejada podrien variar-ne l'eficàcia. Diferències pel que fa al pH final de l'homogenat, contingut d'ions metàl·lics, etc.; així com possibles diferències, àrea dependents, en la conformació de la PrPres que afectessin la susceptibilitat de la PrPres a ser digerida per la PK o el grau d'exposició dels epítops (248). De totes maneres, la tècnica de WB oferia altres avantatges que queden pal·lesos a continuació.

Això ens porta al treball núm. 2. Amb el WB, a part d'obtenir una idea de la quantitat de PrPres en cada àrea, podem determinar paràmetres relatius al perfil molecular de la proteïna estudiada. Paràmetres com el patró de glicosilació i el pes molecular, juntament amb l'afinitat diferencial enfront a diferents anticossos monoclonals (6H4 i P4, en el nostre cas) constituïen unes eines per caracteritzar quina *soca* causa l'encefalopatia en cada cas (74). Sembla que el patró de glicosilació i la conformació són característics de cada agent causal de les diferents EET (21, 70, 249). Les diferències de conformació es tradueixen en diferent susceptibilitat a la digestió per PK, raó per la qual obtindrem diferents valors de pes molecular.

Amb aquesta metodologia hem comprovat que el perfil molecular de tots els casos d'EET en boví és molt similar i concorda amb les descripcions d'EEB clàssica a la literatura (74, 76). Hem pogut diferenciar la PrPres dels dos casos de TO diagnosticats al Priocat. Finalment, hem evidenciat l'absència de casos atípics. Com hem comentat abans, la forma de la BPDC (treball núm. 1), ens indica també si la distribució de PrPres correspon a un perfil clàssic o atípic.

Arribats a aquest punt ja hem assolit el primer objectiu: sabem que treballem amb casos d'EEB clàssica. El fet que el nivell de lesió és lleu juntament a l'absència de simptomatologia clínica, ens permet deduir que es tracta de casos que, malgrat que, alguns d'ells, presenten un abundant dipòsit de PrPres, es troben en fases inicials de la neurodegeneració. L'estudi de la patogènia en aquest moment de la malaltia, abans que es s'evidenciï la neurodegeneració o sobrevinguin les conseqüències de la mort neuronal, és interessant amb vistes a caracteritzar processos que succeeixen en aquestes fases. Aquests processos poden esdevenir dianes terapèutiques o fins i tot, marcadors precoços de la malaltia. Evitarem utilitzar el terme *casos preclínics* ja que si bé els animals no van presentar símptomes nerviosos, és cert que no se'ls va fer un examen neurològic específic.

Un cop caracteritzats els casos, el pas següent va ser analitzar en profunditat la distribució de la PrPres, valorant aquest cop la distribució dels diferents patrons de marcatge immunohistoquímic en les diverses regions encefàliques (treball núm. 3).

Com justifiquem l'elecció d'aquest marcador? La PrPres és fins avui l'únic marcador de la malaltia, no tan sols en l'EEB sinó en la resta d'EET. A més, se l'associa amb la infectivitat. De fet, tot i que té detractors, la *hipòtesi de tan sols proteïna* (6) és en la hipòtesi en què es basen la majoria de línies d'investigació que es duen a terme avui en dia. En qualsevol cas, ja sigui

DISCUSSIÓ

l'agent infecció en si mateix o un producte seu, és clar que la PrPres està implicada en els processos que culminaran en la neurodegeneració (250).

Els patrons d'immunomarcatge representen diferents localitzacions subcel·lulars de la PrPres: intracitoplasmàtica en el cas del patró intraneuronal, axonal en el cas del patró lineal o associat a cèl·lules de la glia, en el cas del patró estrellat (142).

Amb el nostre estudi hem demostrat que la incidència dels diferents patrons depèn estadísticament de l'àrea que estem avaluant. Molts d'ells els trobem associats a àrees del tronc de l'encèfal. El raonament per explicar això és el mateix que hem utilitzat abans, com que són les àrees per on l'agent ha accedit al sistema nerviós, d'alguna manera fa més temps que la PrPres s'hi està acumulant. Trobem altres àrees, com l'escorça occipital, en què és estadísticament significativa l'absència de certs patrons. El raonament seria un altre cop el mateix: essent una àrea allunyada del tronc i amb relativament poques connexions funcionals amb aquest, la PrPres no ha tingut temps d'acumular-s'hi.

Però quina informació podem extreure d'aquest estudi sobre la propagació de la PrPres per l'encèfal. Està descrit que la PrPres es pot moure per transport axonal (251); això justifica patrons com el lineal i també el perineuronal. D'altra banda, també és conegut que la PrP s'excreta a l'espai extracel·lular i pot entrar en contacte amb altres neurones (42). Entenem que es donaria una propagació de la PrPres per proximitat o contacte entre neurones i també entre neurones que funcionalment estan connectades. D'altra banda la PrPres que es troba a l'espai extracel·lular pot ser fagocitada per cèl·lules glials (142).

Durant la quantificació dels diferents patrons ens va cridar l'atenció el fet que en àrees on la quantitat de PrPres detectada era relativament baixa, per exemple àrees del neocòrtex, un dels patrons, l'estrellat semblava aparèixer amb major freqüència que els altres. Mitjançant el càlcul del valor *Kappa* entre la incidència del patró estrellat i la dels altres patrons vam demostrar que, efectivament, al neocòrtex el patró estrellat apareixia en major incidència que la resta de patrons. Basant-se en criteris morfològics i topogràfics s'ha relacionat el patró estrellat amb les poblacions glials (73). Això suggeriria que la glia podia tenir un paper important en la difusió de la PrPres cap a aquelles àrees encefàliques.

En el treball núm. 3 vam intentar identificar, sense èxit i mitjançant tècniques de doble marcatge quin tipus cel·lular contenia el patró estrellat. Malgrat tot hem descrit, per primer cop en EEB, la colocalització de dipòsits de PrPres en cèl·lules GFAP positives (astròcits), però sense adoptar el patró estrellat. Aquest resultat coincideix amb l'obtingut per altres grups en TO (154). Tampoc no hem observat colocalització del patró estrellat de PrPres amb el marcador de cèl·lules de la micròglia que hem utilitzat, la lectina de *Griffonia simplicifolia* (LGS).

DISCUSSIÓ

En qualsevol cas, no descartem que el patró estrellat estigui relacionat amb la glia, ja que, per exemple, l'expressió de GFAP als astròcits protoplasmàtics pot ser menor (149) o estar disminuïda a causa de la presència de dipòsits de PrPres. En qualsevol cas, les nostres troballes indiquen que la propagació de PrP no es limita al pas de neurona a neurona, com demostren patrons del tipus intraneuronal, perineuronal, lineal, etc. sinó que pot implicar també altres tipus cel·lulars.

Aquest resultat ens condueix cap a l'estudi de les poblacions gials, no tan sols per la seva implicació, tal com han suggerit els resultats descrits a l'apartat anterior, sinó també perquè la resposta glial ha estat descrita com una troballa típica en la majoria d'EET (41, 94, 252).

En aquest sentit l'estudi de la distribució encefàlica de l'immunomarcatge de la GFAP va donar resultats força predicibles. És en aquelles regions amb major dipòsit de PrPres on s'apreciava un major increment del marcatge de GFAP, la qual cosa evidenciava hipertròfia i proliferació d'astròcits. Es va aplicar també un altre marcador de citoesquelet, la vimentina. Aquest filament intermedi s'expressa en astròcits durant el desenvolupament del sistema nerviós; en astròcits madurs la seva reexpressió s'ha associat a funcions de migració cel·lular (253). Segons els nostres resultats la reexpressió de vimentina en astròcits només ocorre quan el dipòsit de PrPres està ben establert (per exemple, al tronc encefàlic del cas 5 d'EEB del treball núm. 1). Així doncs, aquest resultat no donaria suport a la hipòtesi que astròcits vimentina positius, per tant, que migren, fossin els encarregats de transportar la PrPres a regions de l'encèfal allunyades del tronc. El doble marcatge VIM-PrPres tampoc no va mostrar cap mena de colocalització. Sembla, doncs, que el paper dels astròcits vimentina positius es podria categoritzar de reactiu enfront dels fenòmens de neurodegeneració que succeeixen ja en els casos més avançats.

Mitjançant la lectina de *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* hem aconseguit marcar les cèl·lules de la micròglia. Malauradament, el rendiment de la tècnica no ha estat suficient per caracteritzar de forma completa la resposta microglial ja que el marcat soroll de fons impedia fer-ne una bona quantificació. Tot i així ens ha permès observar, qualitativament parlant, una activació d'aquesta població glial en els casos d'EEB. El que no podem determinar és si ha estat aquesta micròglia activada la que ha provocat la resposta astroglial tal com suggereixen que passa estudis en models in vitro d'EET (162, 254, 255) tampoc no hem pogut determinar si hi ha una evolució en la resposta microglial.

Les metal·lotioneïnes I+II al sistema nerviós s'expressen bàsicament en astròcits i cèl·lules de la micròglia activada i participen en la detoxificació d'ions de metalls pesats, entre altres, del coure (179, 256). El metabolisme d'aquest metall s'ha relacionat en moltes ocasions amb la PrPc, molècula que participaria també en el manteniment de l'equilibri redox (54, 161, 181-183). En estadis precoços de l'MCJ s'ha descrit un augment de l'expressió d'MT I+II (184) així com en moltes malalties neurodegeneratives com ara la malaltia d'Alzheimer, la malaltia de Pick o l'amiotròfia lateral escleròtica (185-187,

DISCUSSIÓ

257). En estudis previs d'EEB s'havia descrit un augment d'MT I+II a la medul·la espinal (188). En els nostres casos hem descrit un augment de l'immunomarcatge d'MT I+II, en diferents àrees encefàliques, que evoluciona de forma paral·lela a l'increment del marcatge de GFAP, al dipòsit de PrPres i a les lesions espongiformes. Un augment de l'expressió de les metal·lotioneïnes es produeix com a conseqüència de la presència d'espècies reactives de l'oxigen o el nitrogen, i es veu exacerbat per la presència d'ions metàl·lics que són alliberats durant els processos d'activació glial (179). Així, en vista dels nostres resultats, podem argumentar que en EEB, les metal·lotioneïnes se sobreexpressen a causa de l'activació glial i juguen un paper de protecció en front dels radicals lliures i dels metalls generats durant els processos d'activació glial que hem descrit; sobretot en aquells casos en fases més avançades.

Per intentar confirmar la presència de fenòmens d'estrès oxidatiu hem aplicat un anticòs anti-residus de tirosina nitrats, marcador de les conseqüències de l'estrès oxidatiu sobre les proteïnes (174). Malgrat la intensa resposta de les MT el nivell de marcatge de nitrotirosina era molt baix en els casos d'EEB estudiats. Això podria indicar que els efectes protectors de les metal·lotioneïnes serien eficients. Caldria descartar, però, amb altres marcadors la presència de conseqüències de l'estrès oxidatiu com ara marcadors de lípids i àcids nucleics oxidats.

En les EET, els processos que porten a la neurodegeneració impliquen fenòmens de mort cel·lular programada (166, 211, 222, 223, 258). En un estudi previ amb mostres d'encèfals de bovins amb EEB utilitzant TUNEL es van trobar indicis mínims d'apoptosi (156). L'estudi immunohistoquímic de la caspasa 3 activada, marcador d'una via comuna de l'apoptosi, no va revelar aquest tipus de fenomen en els casos d'EEB analitzats per nosaltres. La fagocitosis de cèl·lules en apoptosi és força eficient ($T_{1/2} = 2 - 4$ h) raó per la qual és difícil detectar-la si no es tracta d'un fenomen relativament massiu (259). D'altra banda, el nostre estudi no incloïa possibles vies de mort cel·lular no apoptòtica. Així doncs, els nostres resultats ens permetien descartar la via d'apoptosi mitjançada per caspases, almenys en fases inicials de la malaltia.

Les manifestacions clíniques de diverses malalties priòniques, tant humanes com animals, s'han relacionat amb alteracions de la maquinària sinàptica (166, 211-216). Això no ens ha d'estranyar perquè ja hem vist que la PrPc manté una estreta relació amb les proteïnes sinàptiques (44, 46, 260). L'immunomarcatge de les proteïnes sinàptiques SNAP 25 i sinaptofisina en els encèfals de vaques amb EEB va presentar només petites diferències en comparar-lo amb el dels animals control. De fet, fins i tot al voltant de neurones vacuolitzades es conservava el típic marcatge sinàptic perineuronal. Això suggeria que l'alteració de proteïnes sinàptiques era mínima en estadis primerencs de la malaltia, la qual cosa encaixava amb l'absència de simptomatologia nerviosa. De fet, altres estudis semblants en casos d'EEB han descrit canvis molt lleus, en animals clínics (157), o cap mena de canvi (156, 217) en l'immunomarcatge de proteïnes sinàptiques.

DISCUSSIÓ

La PrPc es localitza a la cara externa de la membrana plasmàtica interaccionant amb algun dels components de les xarxes perineuronals de la matriu extracel·lular del sistema nerviós, entre els quals amb els heparan sulfat proteoglicans (201, 202). En casos de l'MCJ s'ha descrit l'alteració de les xarxes perineuronals (marcades amb aglutinina de *W. floribunda*, *Vicia villosa* i un anticòs anti-CSPG) associada a la presència de PrPres (195). En l'estudi que ens ocupa, en els casos d'EEB, l'avaluació del marcatge de xarxes perineuronals mitjançant l'aglutinina de *W. floribunda* (195, 196) va demostrar que, fins i tot en aquelles neurones vacuolitzades es mantenia el marcatge perineuronal intacte. Calen, però, estudis en casos terminals d'EEB o bé amb altres marcadors de components més específics per descartar una implicació de la matriu extracel·lular en la patogènia de l'EEB.

Aquesta preservació de la morfologia del marcatge de les xarxes perineuronals ens serveix de lligam amb el treball núm. 4, en què tampoc no s'havien observat diferències evidents entre el marcatge de WFA en l'encèfal d'ovelles sanes i el d'ovelles en estadis molt avançats de TO.

Abans de seguir la discussió, però, introduiré breument el nou model. Es tracta de casos de camp de TO però que, a diferència dels casos d'EEB, es troben en estadis molt avançats de la malaltia, per no dir terminals. Es tracta de diagnòstics fets, al CNREET a Saragossa, a partir de l'aparició d'un cas en un ramat d'ovelles. Un cop diagnosticat es procedia a fer biòpsies de tercera parpella a la resta del ramat i aquells animals que donaven un resultat positiu passaven a formar part d'un ramat experimental on restaven en observació. Així d'aquests animals se'n coneixia l'evolució clínica. Un cop els animals eren sacrificats, per raons humanitàries, el processat de les mostres era òptim, minimitzant el temps *post mortem* que, recordem-ho, en el cas dels bovins podia ascendir a més de 72h.

En línies generals, el perfil lesional obtingut i la distribució de la proteïna prionica coincideixen amb les descripcions de TO clàssiques. Voldria destacar l'aparició en aquests casos del patró immunohistoquímic conegut com a plaques. Es tracta d'un patró de dipòsit de PrPres, de tipus amiloide, que generalment es troba al voltant dels vasos. El cas es que hi ha publicacions en què descriuen que ovelles amb el genotip ARQ-ARQ no presenten aquest tipus de plaques (73, 261); les ovelles utilitzades en aquest estudi tenien totes aquest genotip. Els factors que influeixen en l'aparició d'un tipus o altre de perfil immunohistoquímic són nombrosos i inclouen: el genotip del gen PRNP, la raça de l'hoste, la dosi, via i moment d'infecció i és clar, la *soca* de l'agent infeccios. Mentre que unes publicacions li atorguen molta importància al genotip (261) d'altres emfatitzen en el paper que hi juga la soca (73, 262). De totes maneres hi ha una publicació en la raça Suffolk (majoritàriament ARQ-ARQ) en què es descriu la presència de plaques (263). En el nostre cas, doncs, probablement es tracta d'una soca diferent de TO que és capaç de generar l'aparició de plaques en aquesta raça tot i que tingui el genotip ARQ-ARQ. Cal comentar que es tracta de la primera descripció a la literatura del perfil immunohistoquímic en ovelles de la raça Rasa Aragonesa.

DISCUSSIÓ

Un cop obtinguda la caracterització lesional i de distribució de PrPres, hem estudiat la població neuronal gabaèrgica utilitzant dos marcadors: la calbindina d28K i la parvalbúmina (PV). Una part de l'interès que tenia l'estudi de la proteïnes lligadores de calci era que havíem trobat tan sols dues descripcions publicades de la seva distribució normal en ovelles adultes (264, 265). En el treball núm. 4 es descriu la distribució de les poblacions gabaèrgiques parvalbúmina i calbindina positives en l'encèfal oví normal.

En el cas de la calbindina, les descripcions anteriors parlaven d'una àmplia distribució de neurones calbindina positives per tot l'encèfal d'ovelles tant neonatals com adultes (264, 265). En el nostre cas només hem pogut demostrar-ne la presència al cerebel, nuclis cerebelars profunds i la medulla oblonga. Una explicació possible de les diferències de marcatge la podríem trobar en el processament de les mostres, mentre que en la majoria d'estudis s'utilitza teixit congelat, nosaltres hem utilitzat teixit fixat en formol, inactivat amb àcid fòrmic i inclòs en parafina.

Finalment hem avaluat les xarxes perineuronals. Es tracta de la primera descripció que es fa en encèfal d'oví de les xarxes perineuronals utilitzant l'aglutinina de *Wisteria floribunda*. L'estudi de les xarxes perineuronals s'ha complementat amb la realització de marcatges dobles de PV i WFA amb els quals hem demostrat com aquesta última marca una gran part, encara que no el 100%, de les xarxes perineuronals de la població gabaèrgica PV positiva. El cas contrari també es dona, és a dir, hi ha neurones negatives a PV que tenen les xarxes positives a WFA. En el nucli reticular talàmic, que és gabaèrgic, sí que veiem que la gran majoria de neurones estan envoltades per xarxes WFA positives.

En comparar el marcatge de les proteïnes lligadores de calci entre animals sans i animals amb TO, en el cas de la calbindina no vam veure-hi diferències. En canvi, en el cas del parvalbúmina, sí; els animals amb TO presentaven una disminució important del marcatge en cossos neuronals i, sobretot, de prolongacions. Això era més conspicu a les escorçes frontal, occipital i parietal, la banya d'Amon de l'hipocamp i al nucli reticular talàmic.

En aquestes regions hi havíem descrit prèviament una espongiosi lleu (valors entre 1 i 2 al perfil) i sempre s'hi podien observar dipòsits de PrPres. El patró més abundant sempre era el puntejat fi, seguit per l'estrellat en el cas de les escorçes i, en el cas de l'NRT, pel granulat groller i l'intraneuronal.

Al nivell ultraestructural patrons de dipòsit de PrPres com ara el puntejat fi o el granular groller es descriuen com a agregats associats a membrana de neurites (165). Així doncs, és temptador relacionar el fet que aquestes neurites es trobin afectades pel dipòsit de PrPres amb la disminució del marcatge de PV. De fet, s'ha descrit en models de TO en rosegadors, en fases primerenques, una pèrdua d'espines dendrítiques (214, 242). La distribució similar que mostra el marcatge de neurones PV positives i la PrPsc, per exemple, a les capes profundes del neocòrtex dona suport a la hipòtesi que aquesta subpoblació podria estar afectada selectivament, si bé és cert que

DISCUSSIÓ

s'haurien de fer dobles marcatges de PrPres-PV per asseverar que estan marcant la mateixa població.

S'han descrit troballes similars a les nostres en el context de les malalties priòniques humanes (237-239) i també en models experimentals de TO (240). Més encara, un estudi recent en hámsters inoculats intracerebralment amb l'agent de TO parla d'una alteració dels botons presinàptics en neurones gabaèrgiques (243). En aquest model, però, no es descriu pèrdua de neurones ni PV ni GABA positives. Un període d'incubació molt curt (60-70 dies postinoculació) i una via d'inoculació massa diferent de la natural, que suposadament és l'oral, fa difícil comparar els resultats d'aquest model amb la malaltia en la seva forma salvatge.

En els animals amb TO, en comparar l'estat de les xarxes perineuronals, les quals hem vist que mostraven una estreta relació amb la població PV positiva, hem observat com aquestes xarxes estaven preservades, però no només en les neurones que presentaven alteracions en el marcatge de PV, sinó que també es mantien en neurones clarament vacuolitzades. Aquests resultats entren en contraposició amb estudis duts a terme en encèfals d'humans amb l'MCJ (195) i en models de TO murins (237-239). En aquests estudis es descriu una destrucció precoç de les xarxes perineuronals la qual, suggereixen, és una de les causes de la neurodegeneració. Un dels marcadors utilitzats en aquests estudis és el mateix que s'ha fet servir al nostre (WFA) l'altre és la isolectina B4 (de *Vicia villosa*) una lectina que s'uneix al mateix sucre que la WFA (266). Així doncs, podem hipotetitzar que la disrupció de les xarxes perineuronals no és un factor clau en la patogènia dels nostres casos de camp de TO.

Hem descrit, en encèfals d'ovelles afectades de TO, en estadis avançats/terminals, una reducció del marcatge de cossos neuronals i neurites per part de l'anticòs monoclonal anti-PV en determinades regions encefàliques. Això ho hem relacionat amb un grau d'espongiosi lleu, un dipòsit de PrPres evident però amb una preservació aparent de les xarxes perineuronals, avaluades amb WFA. El fet que les xarxes perineuronals estiguin preservades suggereix que la reducció del marcatge de PV sigui deguda a una regulació a la baixa de l'expressió de la proteïna en qüestió i no tant a una mort de la subpoblació neuronal. En infeccions de TO en ratolins (dades no publicades) hem observat que la ruptura de xarxes perineuronals s'associa a fenòmens de gliosi; en el present estudi la gliosi s'ha avaluat morfològicament i els canvis observats a les regions on el marcatge de PV estava alterat eren mínims.

Creiem que l'afecció d'àrees de funció motora (escorça frontal) o relacionades amb l'estat mental (hipocamp, nucli reticular talàmic) tant per al dipòsit de PrPres com per a alteracions a la subpoblació gabaèrgica PV+, poden explicar, parcialment, signes clínics com ara els tremolors o alteracions de l'estat mental com la hiperexcitabilitat. De totes maneres, no podem excloure la implicació d'altres vies, ja que signes com l'atàxia assenyalen cap a estructures cerebel·loses que no han mostrat alteracions en el marcatge de cap de les proteïnes lligadores de calci utilitzades en aquest estudi.

DISCUSSIÓ

No ens hem plantejat dur a terme l'estudi de poblacions gabaèrgiques en els casos d'EEB, entre altres motius, perquè aquests no mostraven simptomatologia i és, per tant, poc probable que trobem alteracions en aquest nivell. També ho justifica l'elevat temps *post mortem* dels teixits.

Per acabar la discussió i abans d'exposar les conclusions he cregut convenient considerar els avantatges i els inconvenients dels dos models estudiats en aquesta tesi, ja que, en darrera instància, és només a partir del model utilitzat que es poden extreure conclusions certes.

En ambdues malalties es tracta de casos de camp. No cal justificar la importància que té l'estudi de la malaltia en la seva presentació natural. També es cert que el fet que siguin casos de camp implica que certs factors queden fora de l'abast del nostre control; aquest tipus de control només es pot assolir en plantejaments experimentals on factors com l'agent infecció, la via d'entrada, la dosi, el moment d'infecció, etc., els determina l'investigador. A més a més, en el cas de l'EEB, la via d'adquisició de mostres fa que desconeguem l'estat clínic real dels casos ja que no han estat sotmesos a un examen neurològic específic, i fa també que el temps *post mortem* abans de la seva fixació/congelació sigui prou llarg per provocar artefactes. En el cas de la TO, controlem el moment de la fase clínic en el qual es troben els animals, també hem pogut minimitzar el temps *post mortem* i s'han aconseguit mostres d'una qualitat molt elevada, que ens han permès estudiar paràmetres com les poblacions neuronals, mitjançant la detecció de proteïnes lligadores de calci.

Volem emfatitzar l'interès que presenta l'estudi dels mecanismes patogènics en casos d'EEB en fases inicials tant per desenvolupar possibles estratègies terapèutiques com per determinar marcadors inicials de la malaltia. D'altra banda és cert que l'estudi de les fases terminals, com hem fet amb la TO, també és interessant ja que la mera presència de símptomes nerviosos reforça la hipòtesi que s'estan produint canvis a les neurones, canvis que hem intentat explicar.

La justificació d'aquest estudi és, doncs, clara: l'EEB i la TO no només representen un model d'estudi per a les malalties priòniques humanes sinó que la seva estreta relació amb la variant de la MCJ fa que sigui imperant entendre'n la patogènia.

Finalment, volem recalcar que tot i l'auge que ha tingut la recerca en malalties priòniques en les últimes dues dècades, els agents que les causen són encara uns grans desconeguts i estan considerats agents no convencionals. Per tot això creiem en la importància de dedicar esforços de recerca bàsica en aquest àmbit.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Pel que fa als casos d'encefalopatia espongiforme bovina:

1. Hem caracteritzat casos estudiats com a casos en fases inicials de la neurodegeneració. La BPDC (corba encefàlica de distribució de PrPres) ens ha permès interpretar la diferent distribució de PrPres als encèfals com a diferents moments en l'evolució de la malaltia, basant-nos en una hipòtesi de disseminació del dipòsit de PrPres des de la seva entrada al tronc encefàlic caudal i progressant cap a estructures més rostrals.
2. La tècnica de transferència Western és més sensible a l'hora de detectar PrPres en regions encefàliques fora de l'òbex i amb menor quantitat de PrPres que l'assaig d'immunoabsorció amb luminiscència.
3. Segons el perfil molecular, obtingut amb el WB, els casos pertanyen a una mateixa *soca* que coincideix amb la descripció clàssica de l'EEB. Descartem, per tant, la presència de casos atípics en els casos diagnosticats a Catalunya. La forma de la BPDC recolza aquesta afirmació.
4. El perfil molecular ens permet diferenciar l'agent causal de la TO i l'EEB. També descartem que els dos casos de TO diagnosticats siguin atípics o originats per EEB.
5. La incidència dels patrons de marcatge immunohistoquímic de la PrPres depèn estadísticament de l'àrea encefàlica estudiada. Els diferents patrons mostren un tropisme per les àrees del tronc encefàlic, coincidint amb la hipòtesi de disseminació de la PrPres obtinguda amb la BPDC.
6. Al neocòrtex el patró estrellat, associat a la glia, apareix amb una incidència comparativament major a la de la resta de patrons. Això suggereix una especial implicació de la glia en la disseminació de la PrPres cap a aquesta regió de l'encèfal.
7. Hem descrit per primer cop que les cèl·lules GFAP positives (astròcits) presenten acúmuls de PrPres.
8. No s'ha observat colocalització del patró estrellat de PrPres amb marcadors astrocitaris (GFAP, vimentina) ni micrògials (lectina de *Griffonia simplicifolia*).
9. Hi ha una activació astrocitària (valorada amb GFAP) que és més marcada com major és el dipòsit de PrPres. Alguns d'aquests astròcits reexpressen el filament intermedi vimentina, associat a fenòmens de migració cel·lular.

CONCLUSIONS

10. Hem descrit per primer cop l'activació de la micròglia.
11. Hi ha un increment del marcatge de metal·lotioneïnes I+II paral·lel a l'increment de GFAP i PrPres. Això suggereix la presència de fenòmens d'estrès oxidatiu.
12. La manca de marcatge de caspasa 3 activada suggereix que no hi ha processos d'apoptosi actius.
13. En les fases inicials de la neurodegeneració hi ha una preservació de les xarxes perineuronals marcades per WFA i del marcatge de proteïnes sinàptiques (SYN i SNAP25).

En relació als casos de tremolor ovina en ovelles de raça Rasa Aragonesa:

14. Els perfils lesional i immunohistoquímic coincideixen amb les descripcions clàssiques de la malaltia en altres races, excepte pel fet que, tot i portar el genotip ARQ-ARQ en el gen prnp, presentin plaques de PrPres. Aquest patró d'immunomarcatge no està descrit en altres races ovines amb aquest genotip.
15. Una vegada determinades la distribució normal dels marcadors de proteïnes lligadores de calci; calbindina D28k i parvalbúmina, i del marcador de xarxes perineuronals aglutinina de *Wisteria floribunda*, trobem una disminució del marcatge de somes i prolongacions neuronals. Aquest canvi coincideix amb un grau de lesió lleu, dipòsit evident de PrPres i preservació de les xarxes perineuronals.
16. Canvis observats en les subpoblacions gabaèrgiques en àrees motores (escorça frontal) i àrees relacionades amb l'estat mental (hipocamp, nucli reticular talàmic) podrien explicar signes clínics observats com ara la tremolor o la hiperexcitabilitat, respectivament.

REFERÈNCIES

REFERÈNCIES

1. Bruce ME, Will RG, Ironside JW, McConnell I, Drummond D, Suttie A, McCardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Bostock CJ. Transmissions to mice indicate that 'new variant' CJD is caused by the BSE agent. *Nature*. 1997 Oct 2;389(6650):498-501.
2. Badiola JJ, Monleon E, Monzon M, Acin C, Lujan L, Fernandez D, Simmons M, Vargas A. Description of the first cases of BSE in Spain. *Vet Rec*. 2002 Oct 26;151(17):509-10.
3. Fontaine N, Winberg M. Reglamento (CE) N° 999/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de mayo de 2001 por el que se establecen disposiciones para la prevención, el control y la erradicación de determinadas ees's. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE)*; 2001. p. 1-37.
4. Wells GA, Wilesmith JW. The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy. *Brain Pathol*. 1995 Jan;5(1):91-103.
5. Haritani M, Spencer YI, Wells GA. Hydrated autoclave pretreatment enhancement of prion protein immunoreactivity in formalin-fixed bovine spongiform encephalopathy-affected brain. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1994;87(1):86-90.
6. Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathol*. 1998 Jul;8(3):499-513.
7. Biffiger K, Zwald D, Kaufmann L, Briner A, Nayki I, Purro M, Bottcher S, Struckmeyer T, Schaller O, Meyer R, Fatzer R, Zurbriggen A, Stack M, Moser M, Oesch B, Kubler E. Validation of a luminescence immunoassay for the detection of PrP(Sc) in brain homogenate. *J Virol Methods*. 2002 Mar;101(1-2):79-84.
8. Schaller O, Fatzer R, Stack M, Clark J, Cooley W, Biffiger K, Egli S, Doherr M, Vandevelde M, Heim D, Oesch B, Moser M. Validation of a western immunoblotting procedure for bovine PrP(Sc) detection and its use as a rapid surveillance method for the diagnosis of bovine spongiform encephalopathy (BSE). *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999 Nov;98(5):437-43.
9. Oesch B, Doherr M, Heim D, Fischer K, Egli S, Bolliger S, Biffiger K, Schaller O, Vandevelde M, Moser M. Application of Prionics Western blotting procedure to screen for BSE in cattle regularly slaughtered at Swiss abattoirs. *Arch Virol Suppl*. 2000(16):189-95.
10. Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raeber A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B. Prion (PrPSc)-specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature*. 1997 Nov 6;390(6655):74-7.

REFERÈNCIES

11. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science*. 1982 Apr 9;216(4542):136-44.
12. Gajdusek C. Discussion on kuru, scrapie and the experimental kuru-like syndrome in chimpanzees. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1967;40:59-63.
13. Gajdusek DC, Zigas V. Degenerative disease of the central nervous system in New Guinea; the endemic occurrence of kuru in the native population. *N Engl J Med*. 1957 Nov 14;257(20):974-8.
14. Hadlow WJ. Neuropathology and the scrapie-kuru connection. *Brain Pathol*. 1995 Jan;5(1):27-31.
15. Gajdusek DC. Slow-virus infections of the nervous system. *N Engl J Med*. 1967 Feb 16;276(7):392-400.
16. Hadlow WJ, Eklund CM. Scrapie--a virus-induced chronic encephalopathy of sheep. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis*. 1968;44:281-306.
17. Bolton DC, McKinley MP, Prusiner SB. Identification of a protein that purifies with the scrapie prion. *Science*. 1982 Dec 24;218(4579):1309-11.
18. Chesebro B, Race R, Wehrly K, Nishio J, Bloom M, Lechner D, Bergstrom S, Robbins K, Mayer L, Keith JM, et al. Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain. *Nature*. 1985 May 23-29;315(6017):331-3.
19. Oesch B, Westaway D, Walchli M, McKinley MP, Kent SB, Aebersold R, Barry RA, Tempst P, Teplow DB, Hood LE, et al. A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein. *Cell*. 1985 Apr;40(4):735-46.
20. Basler K, Oesch B, Scott M, Westaway D, Walchli M, Groth DF, McKinley MP, Prusiner SB, Weissmann C. Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene. *Cell*. 1986 Aug 1;46(3):417-28.
21. Chien P, Weissman JS, DePace AH. Emerging principles of conformation-based prion inheritance. *Annu Rev Biochem*. 2004;73:617-56.
22. Legname G, Baskakov IV, Nguyen HO, Riesner D, Cohen FE, DeArmond SJ, Prusiner SB. Synthetic mammalian prions. *Science*. 2004 Jul 30;305(5684):673-6.
23. Lasmezas CI, Deslys JP, Robain O, Jaegly A, Beringue V, Peyrin JM, Fournier JG, Hauw JJ, Rossier J, Dormont D. Transmission of the BSE agent to mice in the absence of detectable abnormal prion protein. *Science*. 1997 Jan 17;275(5298):402-5.

REFERÈNCIES

24. Manuelidis L, Murdoch G, Manuelidis EE. Potential involvement of retroviral elements in human dementias. *Ciba Found Symp.* 1988;135:117-34.
25. Kimberlin RH, Walker CA. Pathogenesis of mouse scrapie: patterns of agent replication in different parts of the CNS following intraperitoneal infection. *J R Soc Med.* 1982 Aug;75(8):618-24.
26. Diringler H, Oberdieck U, Malchow M, Beekes M. Transmissible spongiform encephalopathies: virally transmitted amyloidoses. *Dev Biol Stand.* 1993;80:25-9.
27. Weissmann C. A 'unified theory' of prion propagation. *Nature.* 1991 Aug 22;352(6337):679-83.
28. Weissmann C, Kloehn P, Mahal SP, Baker CA, Deleault NR, Supattapone S. Transmission of Prions. *Prion 2005, Between fundamentals and society's needs; 2005; Düsseldorf, Germany; 2005.* p. 63.
29. Bueler H, Fischer M, Lang Y, Bluethmann H, Lipp HP, DeArmond SJ, Prusiner SB, Aguet M, Weissmann C. Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. *Nature.* 1992 Apr 16;356(6370):577-82.
30. Tobler I, Gaus SE, Deboer T, Achermann P, Fischer M, Rulicke T, Moser M, Oesch B, McBride PA, Manson JC. Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein. *Nature.* 1996 Apr 18;380(6575):639-42.
31. Roesler R, Walz R, Quevedo J, de-Paris F, Zanata SM, Graner E, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. Normal inhibitory avoidance learning and anxiety, but increased locomotor activity in mice devoid of PrP(C). *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 Aug 25;71(2):349-53.
32. Weissmann C, Bueler H, Fischer M, Sailer A, Aguzzi A, Aguet M. PrP-deficient mice are resistant to scrapie. *Ann N Y Acad Sci.* 1994 Jun 6;724:235-40.
33. Bueler H, Aguzzi A, Sailer A, Greiner RA, Autenried P, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. *Cell.* 1993 Jul 2;73(7):1339-47.
34. Riek R, Hornemann S, Wider G, Billeter M, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR structure of the mouse prion protein domain PrP(121-321). *Nature.* 1996 Jul 11;382(6587):180-2.
35. Riek R, Hornemann S, Wider G, Glockshuber R, Wuthrich K. NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231). *FEBS Lett.* 1997 Aug 18;413(2):282-8.

REFERÈNCIES

36. Stahl N, Borchelt DR, Hsiao K, Prusiner SB. Scrapie prion protein contains a phosphatidylinositol glycolipid. *Cell*. 1987 Oct 23;51(2):229-40.
37. Vey M, Pilkuhn S, Wille H, Nixon R, DeArmond SJ, Smart EJ, Anderson RG, Taraboulos A, Prusiner SB. Subcellular colocalization of the cellular and scrapie prion proteins in caveolae-like membranous domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Dec 10;93(25):14945-9.
38. Kretzschmar HA, Prusiner SB, Stowring LE, DeArmond SJ. Scrapie prion proteins are synthesized in neurons. *Am J Pathol*. 1986 Jan;122(1):1-5.
39. Matsumoto K, Ebihara K, Yamamoto H, Tabuchi H, Fukunaga K, Yasunami M, Ohkubo H, Shichiri M, Miyamoto E. Cloning from insulinoma cells of synapsin I associated with insulin secretory granules. *J Biol Chem*. 1999 Jan 22;274(4):2053-9.
40. Lasmézas CI. The Transmissible Spongiform Encephalopathies. *Rev sci tech Off int Epiz*. 2003;22(1):23-6.
41. DeArmond SJ. Discovering the mechanisms of neurodegeneration in prion diseases. *Neurochem Res*. 2004 Nov;29(11):1979-98.
42. Campana V, Sarnataro D, Zurzolo C. The highways and byways of prion protein trafficking. *Trends Cell Biol*. 2005 Feb;15(2):102-11.
43. Harris DA. Trafficking, turnover and membrane topology of PrP. *Br Med Bull*. 2003;66:71-85.
44. Herms J, Tings T, Gall S, Madlung A, Giese A, Siebert H, Schurmann P, Windl O, Brose N, Kretzschmar H. Evidence of presynaptic location and function of the prion protein. *J Neurosci*. 1999 Oct 15;19(20):8866-75.
45. Mironov A, Jr., Latawiec D, Wille H, Bouzamondo-Bernstein E, Legname G, Williamson RA, Burton D, DeArmond SJ, Prusiner SB, Peters PJ. Cytosolic prion protein in neurons. *J Neurosci*. 2003 Aug 6;23(18):7183-93.
46. Lasmezas CI. Putative functions of PrP(C). *Br Med Bull*. 2003;66:61-70.
47. Sales N, Rodolfo K, Hassig R, Faucheux B, Di Giamberardino L, Moya KL. Cellular prion protein localization in rodent and primate brain. *Eur J Neurosci*. 1998 Jul;10(7):2464-71.
48. Fournier JG, Escaig-Haye F, Billette de Villemeur T, Robain O. Ultrastructural localization of cellular prion protein (PrPc) in synaptic boutons of normal hamster hippocampus. *C R Acad Sci III*. 1995 Mar;318(3):339-44.
49. Sales N, Hassig R, Rodolfo K, Di Giamberardino L, Traiffort E, Ruat M, Fretier P, Moya KL. Developmental expression of the cellular prion protein in elongating axons. *Eur J Neurosci*. 2002 Apr;15(7):1163-77.

REFERÈNCIES

50. Pan T, Wong BS, Liu T, Li R, Petersen RB, Sy MS. Cell-surface prion protein interacts with glycosaminoglycans. *Biochem J.* 2002 Nov 15;368(Pt 1):81-90.
51. Warner RG, Hundt C, Weiss S, Turnbull JE. Identification of the heparan sulfate binding sites in the cellular prion protein. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18421-30.
52. Graner E, Mercadante AF, Zanata SM, Forlenza OV, Cabral AL, Veiga SS, Juliano MA, Roesler R, Walz R, Minetti A, Izquierdo I, Martins VR, Brentani RR. Cellular prion protein binds laminin and mediates neuritogenesis. *Brain Res Mol Brain Res.* 2000 Mar 10;76(1):85-92.
53. Collinge J, Whittington MA, Sidle KC, Smith CJ, Palmer MS, Clarke AR, Jefferys JG. Prion protein is necessary for normal synaptic function. *Nature.* 1994 Jul 28;370(6487):295-7.
54. Brown DR, Qin K, Herms JW, Madlung A, Manson J, Strome R, Fraser PE, Kruck T, von Bohlen A, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Westaway D, Kretzschmar H. The cellular prion protein binds copper in vivo. *Nature.* 1997 Dec 18-25;390(6661):684-7.
55. Pauly PC, Harris DA. Copper stimulates endocytosis of the prion protein. *J Biol Chem.* 1998 Dec 11;273(50):33107-10.
56. Brown DR, Mohn CM. Astrocytic glutamate uptake and prion protein expression. *Glia.* 1999 Feb 1;25(3):282-92.
57. Kurschner C, Morgan JI. The cellular prion protein (PrP) selectively binds to Bcl-2 in the yeast two-hybrid system. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995 May;30(1):165-8.
58. Paitel E, Alves da Costa C, Vilette D, Grassi J, Checler F. Overexpression of PrPc triggers caspase 3 activation: potentiation by proteasome inhibitors and blockade by anti-PrP antibodies. *J Neurochem.* 2002 Dec;83(5):1208-14.
59. Bounhar Y, Zhang Y, Goodyer CG, LeBlanc A. Prion protein protects human neurons against Bax-mediated apoptosis. *J Biol Chem.* 2001 Oct 19;276(42):39145-9.
60. Solforosi L, Criado JR, McGavern DB, Wirz S, Sanchez-Alavez M, Sugama S, DeGiorgio LA, Volpe BT, Wiseman E, Abalos G, Masliah E, Gildea D, Oldstone MB, Conti B, Williamson RA. Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1514-6.
61. Zou WQ, Cashman NR. Acidic pH and detergents enhance in vitro conversion of human brain PrPc to a PrPSc-like form. *J Biol Chem.* 2002 Nov 15;277(46):43942-7.

REFERÈNCIES

62. Torrent J, Alvarez-Martinez MT, Harricane MC, Heitz F, Liautard JP, Balny C, Lange R. High pressure induces scrapie-like prion protein misfolding and amyloid fibril formation. *Biochemistry*. 2004 Jun 8;43(22):7162-70.
63. Caughey B, Baron GS. Factors affecting interactions between prion protein isoforms. *Biochem Soc Trans*. 2002 Aug;30(4):565-9.
64. Caughey B. Prion protein interconversions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 Feb 28;356(1406):197-200; discussion -2.
65. Serio TR, Cashikar AG, Kowal AS, Sawicki GJ, Moslehi JJ, Serpell L, Arnsdorf MF, Lindquist SL. Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*. 2000 Aug 25;289(5483):1317-21.
66. Supattapone S. Prion protein conversion in vitro. *J Mol Med*. 2004 Jun;82(6):348-56.
67. Deleault NR, Lucassen RW, Supattapone S. RNA molecules stimulate prion protein conversion. *Nature*. 2003 Oct 16;425(6959):717-20.
68. Castilla J, Saa P, Soto C. Detection of prions in blood. *Nat Med*. 2005 Sep;11(9):982-5.
69. Fraser H, Dickinson AG. The sequential development of the brain lesion of scrapie in three strains of mice. *J Comp Pathol*. 1968 Jul;78(3):301-11.
70. Bruce ME. TSE strain variation. *Br Med Bull*. 2003;66:99-108.
71. Green R, Horrocks C, Wilkinson A, Hawkins SA, Ryder SJ. Primary Isolation of the Bovine Spongiform Encephalopathy Agent in Mice: Agent Definition based on a Review of 150 Transmissions. *J Comp Pathol*. 2005 Feb-Apr;132(2-3):117-31.
72. Jeffrey M, Martin S, Gonzalez L. Cell-associated variants of disease-specific prion protein immunolabelling are found in different sources of sheep transmissible spongiform encephalopathy. *J Gen Virol*. 2003 Apr;84(Pt 4):1033-45.
73. Gonzalez L, Martin S, Begara-McGorum I, Hunter N, Houston F, Simmons M, Jeffrey M. Effects of agent strain and host genotype on PrP accumulation in the brain of sheep naturally and experimentally affected with scrapie. *J Comp Pathol*. 2002 Jan;126(1):17-29.
74. Stack MJ, Chaplin MJ, Clark J. Differentiation of prion protein glycoforms from naturally occurring sheep scrapie, sheep-passaged scrapie strains (CH1641 and SSBP1), bovine spongiform encephalopathy (BSE) cases and Romney and Cheviot breed sheep experimentally

REFERÈNCIES

- inoculated with BSE using two monoclonal antibodies. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002 Sep;104(3):279-86.
75. Parchi P, Zou W, Wang W, Brown P, Capellari S, Ghetti B, Kopp N, Schulz-Schaeffer WJ, Kretzschmar HA, Head MW, Ironside JW, Gambetti P, Chen SG. Genetic influence on the structural variations of the abnormal prion protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Aug 29;97(18):10168-72.
 76. Collinge J, Sidle KC, Meads J, Ironside J, Hill AF. Molecular analysis of prion strain variation and the aetiology of 'new variant' CJD. *Nature*. 1996 Oct 24;383(6602):685-90.
 77. Glatzel M, Stoeck K, Seeger H, Luhrs T, Aguzzi A. Human prion diseases: molecular and clinical aspects. *Arch Neurol*. 2005 Apr;62(4):545-52.
 78. Colchester AC, Colchester NT. The origin of bovine spongiform encephalopathy: the human prion disease hypothesis. *Lancet*. 2005 Sep 3;366(9488):856-61.
 79. Creutzfeldt HG. On a particular focal disease of the central nervous system (preliminary communication), 1920. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1989 Spring-Summer;3(1-2):3-25.
 80. Jakob A. Concerning a disorder of the central nervous system clinically resembling multiple sclerosis with remarkable anatomic findings (spastic pseudosclerosis). Report of a fourth case. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 1989 Spring-Summer;3(1-2):26-45.
 81. Parchi P, Giese A, Capellari S, Brown P, Schulz-Schaeffer W, Windl O, Zerr I, Budka H, Kopp N, Piccardo P, Poser S, Rojiani A, Streichemberger N, Julien J, Vital C, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar H. Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects. *Ann Neurol*. 1999 Aug;46(2):224-33.
 82. Gerstmann J. Uber ein noch nicht Beschriebenes Reflexphanomen bei einer Erkrankung des zerebellaren Systems. *Wein Medizin Wochenschr*. 1928;78:906-34.
 83. Jimenez-Huete A, Lievens PM, Vidal R, Piccardo P, Ghetti B, Tagliavini F, Frangione B, Prelli F. Endogenous proteolytic cleavage of normal and disease-associated isoforms of the human prion protein in neural and non-neural tissues. *Am J Pathol*. 1998 Nov;153(5):1561-72.
 84. Lugaresi E MR, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A, Tinuper P, Zucconi M, Gambetti P. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of the thalamic nuclei. *New Engl J Med*. 1986;315:997-1003.

REFERÈNCIES

85. Monari L, Chen SG, Brown P, Parchi P, Petersen RB, Mikol J, Gray F, Cortelli P, Montagna P, Ghetti B, et al. Fatal familial insomnia and familial Creutzfeldt-Jakob disease: different prion proteins determined by a DNA polymorphism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Mar 29;91(7):2839-42.
86. Parchi P, Capellari S, Gambetti P. Intracerebral distribution of the abnormal isoform of the prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal insomnia. *Microsc Res Tech*. 2000 Jul 1;50(1):16-25.
87. Hadlow W. Scrapie and Kuru. *Lancet*. 1959;2:289-90.
88. Poser CM. Notes on the history of the prion diseases. Part I. *Clin Neurol Neurosurg*. 2002 Jan;104(1):1-9.
89. Foster JD, McKelvey WA, Mylne MJ, Williams A, Hunter N, Hope J, Fraser H. Studies on maternal transmission of scrapie in sheep by embryo transfer. *Vet Rec*. 1992 Apr 18;130(16):341-3.
90. Foster J, Hunter N. Transmissible spongiform encephalopathies: transmission, mechanism of disease, and persistence. *Curr Opin Microbiol*. 1998 Aug;1(4):442-7.
91. Houston EF, Gravenor MB. Clinical signs in sheep experimentally infected with scrapie and BSE. *Vet Rec*. 2003 Mar 15;152(11):333-4.
92. Healy AM, Weavers E, McElroy M, Gomez-Parada M, Collins JD, O'Doherty E, Sweeney T, Doherty ML. The clinical neurology of scrapie in Irish sheep. *J Vet Intern Med*. 2003 Nov-Dec;17(6):908-16.
93. van Keulen LJ, Vromans ME, van Zijderveld FG. Early and late pathogenesis of natural scrapie infection in sheep. *Apmis*. 2002 Jan;110(1):23-32.
94. Wood JL, 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 Feb 15;140(7):167-74.
95. Hunter N, Goldmann W, Marshall E, O'Neill G. Sheep and goats: natural and experimental TSEs and factors influencing incidence of disease. *Arch Virol Suppl*. 2000(16):181-8.
96. Atkinson M. National scrapie plan. *Vet Rec*. 2001 Oct 13;149(15):462.
97. 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.
98. Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells GA, Wilesmith JW. Naturally occurring scrapie-like spongiform

REFERÈNCIES

- encephalopathy in five domestic cats. *Vet Rec.* 1991 Sep 14;129(11):233-6.
99. Eloit M, Adjou K, Couplier M, Fontaine JJ, Hamel R, Lilin T, Messiaen S, Andreoletti O, Baron T, Bencsik A, Biacabe AG, Beringue V, Laude H, Le Dur A, Vilotte JL, Comoy E, Deslys JP, Grassi J, Simon S, Lantier F, Sarradin P. BSE agent signatures in a goat. *Vet Rec.* 2005 Apr 16;156(16):523-4.
 100. Braun U. [Clinical signs and diagnosis of BSE]. *Schweiz Arch Tierheilkd.* 2002 Dec;144(12):645-52.
 101. Sander P, Hamann H, Pfeiffer I, Wemheuer W, Brenig B, Groschup MH, Ziegler U, Distl O, Leeb T. Analysis of sequence variability of the bovine prion protein gene (PRNP) in German cattle breeds. *Neurogenetics.* 2004 Feb;5(1):19-25.
 102. Williams ES, Young S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *J Wildl Dis.* 1980 Jan;16(1):89-98.
 103. Barlow RM. Transmissible mink encephalopathy: pathogenesis and nature of the aetiological agent. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol).* 1972;6:102-9.
 104. Willoughby K, Kelly DF, Lyon DG, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a captive puma (*Felis concolor*). *Vet Rec.* 1992 Nov 7;131(19):431-4.
 105. Pearson GR, Gruffydd-Jones TJ, Wyatt JM, Hope J, Chong A, Scott AC, Dawson M, Wells GA. Feline spongiform encephalopathy. *Vet Rec.* 1991 Jun 1;128(22):532.
 106. Cunningham AA, Wells GA, Scott AC, Kirkwood JK, Barnett JE. Transmissible spongiform encephalopathy in greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Vet Rec.* 1993 Jan 16;132(3):68.
 107. Fleetwood AJ, Furley CW. Spongiform encephalopathy in an eland. *Vet Rec.* 1990 Apr 21;126(16):408-9.
 108. Jeffrey M, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Vet Pathol.* 1988 Sep;25(5):398-9.
 109. Kirkwood JK, Cunningham AA. Epidemiological observations on spongiform encephalopathies in captive wild animals in the British Isles. *Vet Rec.* 1994 Sep 24;135(13):296-303.
 110. Bons N, Mestre-Frances N, Charnay Y, Tagliavini F. Spontaneous spongiform encephalopathy in a young adult rhesus monkey. *Lancet.* 1996 Jul 6;348(9019):55.
 111. Benestad SL, Sarradin P, Thu B, Schonheit J, Tranulis MA, Bratberg B. Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98. *Vet Rec.* 2003 Aug 16;153(7):202-8.

REFERÈNCIES

112. Le Dur A, Beringue V, Andreoletti 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.
113. Buschmann A, Biacabe AG, Ziegler U, Bencsik A, Madec JY, Erhardt G, Luhken G, Baron T, Groschup MH. Atypical scrapie cases in Germany and France are identified by discrepant reaction patterns in BSE rapid tests. *J Virol Methods*. 2004 Apr;117(1):27-36.
114. Buschmann A, Luhken G, Schultz J, Erhardt G, Groschup MH. Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). *J Gen Virol*. 2004 Sep;85(Pt 9):2727-33.
115. Orge L, Galo A, Machado C, Lima C, Ochoa C, Silva J, Ramos M, Simas JP. Identification of putative atypical scrapie in sheep in Portugal. *J Gen Virol*. 2004 Nov;85(Pt 11):3487-91.
116. Gretzschel A, Buschmann A, Eiden M, Ziegler U, Luhken G, Erhardt G, Groschup MH. Strain typing of german transmissible spongiform encephalopathies field cases in small ruminants by biochemical methods. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2005 Mar;52(2):55-63.
117. Gavier-Widen D, Noremark M, Benestad S, Simmons M, Renstrom L, Bratberg B, Elvander M, af Segerstad CH. Recognition of the Nor98 variant of scrapie in the Swedish sheep population. *J Vet Diagn Invest*. 2004 Nov;16(6):562-7.
118. Casalone C, Zanusso G, Acutis P, Ferrari S, Capucci L, Tagliavini F, Monaco S, Caramelli M. Identification of a second bovine amyloidotic spongiform encephalopathy: Molecular similarities with sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *PNAS*. 2004 February 17, 2004:0305777101.
119. Onnasch H, Gunn HM, Bradshaw BJ, Benestad SL, Bassett HF. Two Irish cases of scrapie resembling Nor98. *Vet Rec*. 2004 Nov 13;155(20):636-7.
120. Yamakawa Y, Hagiwara K, Nohtomi K, Nakamura Y, Nishijima M, Higuchi Y, Sato Y, Sata T. Atypical proteinase K-resistant prion protein (PrPres) observed in an apparently healthy 23-month-old Holstein steer. *Jpn J Infect Dis*. 2003 Oct-Dec;56(5-6):221-2.
121. Biacabe AG, Laplanche JL, Ryder S, Baron T. Distinct molecular phenotypes in bovine prion diseases. *EMBO Rep*. 2004 Jan;5(1):110-5.
122. Foster JD, Hunter N, Williams A, Mylne MJ, McKelvey WA, Hope J, Fraser H, Bostock C. Observations on the transmission of scrapie in experiments using embryo transfer. *Vet Rec*. 1996 Jun 8;138(23):559-62.

REFERÈNCIES

123. Heggebo R, Gonzalez L, Press CM, Gunnes G, Espenes A, Jeffrey M. Disease-associated PrP in the enteric nervous system of scrapie-affected Suffolk sheep. *J Gen Virol.* 2003 May;84(Pt 5):1327-38.
124. 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 Jan 14;278(3):181-4.
125. Glatzel M, Aguzzi A. Peripheral pathogenesis of prion diseases. *Microbes Infect.* 2000 May;2(6):613-9.
126. Mabbott NA, Bruce ME. The immunobiology of TSE diseases. *J Gen Virol.* 2001 Oct;82(Pt 10):2307-18.
127. Klein MA, Frigg R, Flechsig E, Raeber AJ, Kalinke U, Bluethmann H, Bootz F, Suter M, Zinkernagel RM, Aguzzi A. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature.* 1997 Dec 18-25;390(6661):687-90.
128. Ligios C, Sigurdson CJ, Santucci C, Carcassola G, Manco G, Basagni M, Maestrale C, Cancedda MG, Madau L, Aguzzi A. PrPSc in mammary glands of sheep affected by scrapie and mastitis. *Nat Med.* 2005 Nov;11(11):1137-8.
129. Seeger H, Heikenwalder M, Zeller N, Kranich J, Schwarz P, Gaspert A, Seifert B, Miele G, Aguzzi A. Coincident scrapie infection and nephritis lead to urinary prion excretion. *Science.* 2005 Oct 14;310(5746):324-6.
130. Beekes M, McBride PA, Baldauf E. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *J Gen Virol.* 1998 Mar;79 (Pt 3):601-7.
131. Hunter N, Foster J, Chong A, McCutcheon S, Parnham D, Eaton S, MacKenzie C, Houston F. Transmission of prion diseases by blood transfusion. *J Gen Virol.* 2002 Dec;83(Pt 11):2897-905.
132. Jeffrey M, Begara-McGorum I, Clark S, Martin S, Clark J, Chaplin M, Gonzalez L. Occurrence and distribution of infection-specific PrP in tissues of clinical scrapie cases and cull sheep from scrapie-affected farms in Shetland. *J Comp Pathol.* 2002 Nov;127(4):264-73.
133. Buschmann A, Groschup MH. Highly bovine spongiform encephalopathy-sensitive transgenic mice confirm the essential restriction of infectivity to the nervous system in clinically diseased cattle. *J Infect Dis.* 2005 Sep 1;192(5):934-42.
134. Zanusso G, Ferrari S, Cardone F, Zampieri P, Gelati M, Fiorini M, Farinazzo A, Gardiman M, Cavallaro T, Bentivoglio M, Righetti PG, Pocchiari M, Rizzuto N, Monaco S. Detection of pathologic prion protein in the olfactory epithelium in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med.* 2003 Feb 20;348(8):711-9.

REFERÈNCIES

135. Bartz JC, Kincaid AE, Bessen RA. Rapid prion neuroinvasion following tongue infection. *J Virol*. 2003 Jan;77(1):583-91.
136. Manuelidis L, Fritch W, Xi YG. Evolution of a strain of CJD that induces BSE-like plaques. *Science*. 1997 Jul 4;277(5322):94-8.
137. Thomzig A, Kratzel C, Lenz G, Kruger D, Beekes M. Widespread PrP^{Sc} accumulation in muscles of hamsters orally infected with scrapie. *EMBO Rep*. 2003 May;4(5):530-3.
138. Glatzel M, Abela E, Maissen M, Aguzzi A. Extraneural pathologic prion protein in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *N Engl J Med*. 2003 Nov 6;349(19):1812-20.
139. Thomzig A, Schulz-Schaeffer W, Kratzel C, Mai J, Beekes M. Preclinical deposition of pathological prion protein PrP(Sc) in muscles of hamsters orally exposed to scrapie. *J Clin Invest*. 2004 May;113(10):1465-72.
140. Somerville RA, Merz PA, Carp RI. Partial copurification of scrapie-associated fibrils and scrapie infectivity. *Intervirology*. 1986;25(1):48-55.
141. DeArmond SJ, Yang SL, Lee A, Bowler R, Taraboulos A, Groth D, Prusiner SB. Three scrapie prion isolates exhibit different accumulation patterns of the prion protein scrapie isoform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Jul 15;90(14):6449-53.
142. Gonzalez L, Martin 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 May 1, 2003;84(5):1339-50.
143. Ersdal C, Simmons MM, Gonzalez L, Goodsir CM, Martin S, Jeffrey M. Relationships between ultrastructural scrapie pathology and patterns of abnormal prion protein accumulation. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2004 May;107(5):428-38.
144. Jeffrey M, Ryder S, Martin S, Hawkins SA, Terry L, Berthelin-Baker C, Bellworthy SJ. Oral inoculation of sheep with the agent of bovine spongiform encephalopathy (BSE). 1. Onset and distribution of disease-specific PrP accumulation in brain and viscera. *J Comp Pathol*. 2001 May;124(4):280-9.
145. Race RE, Priola SA, Bessen RA, Ernst D, Dockter J, Rall GF, Mucke L, Chesebro B, Oldstone MB. Neuron-specific expression of a hamster prion protein minigene in transgenic mice induces susceptibility to hamster scrapie agent. *Neuron*. 1995 Nov;15(5):1183-91.
146. Raeber AJ, Race RE, Brandner S, Priola SA, Sailer A, Bessen RA, Mucke L, Manson J, Aguzzi A, Oldstone MB, Weissmann C, Chesebro B. Astrocyte-specific expression of hamster prion protein (PrP) renders PrP

REFERÈNCIES

- knockout mice susceptible to hamster scrapie. *Embo J.* 1997 Oct 15;16(20):6057-65.
147. Prinz M, Montrasio F, Furukawa H, van der Haar ME, Schwarz P, Rulicke T, Giger OT, Hausler KG, Perez D, Glatzel M, Aguzzi A. Intrinsic resistance of oligodendrocytes to prion infection. *J Neurosci.* 2004 Jun 30;24(26):5974-81.
 148. Budka H, Aguzzi A, Brown P, Brucher JM, Bugiani O, Gullotta F, Haltia M, Hauw JJ, Ironside JW, Jellinger K, et al. Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases). *Brain Pathol.* 1995 Oct;5(4):459-66.
 149. Bignami A, Dahl D. Specificity of the glial fibrillary acidic protein for astroglia. *J Histochem Cytochem.* 1977 Jun;25(6):466-9.
 150. Muhleisen H, Gehrman J, Meyermann R. Reactive microglia in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1995 Dec;21(6):505-17.
 151. Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B. Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in amoeboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem.* 1994 Aug;42(8):1033-41.
 152. Hewicker-Trautwein M, Schultheis G, Trautwein G. Demonstration of amoeboid and ramified microglial cells in pre- and postnatal bovine brains by lectin histochemistry. *Anat Anz.* 1996 Jan;178(1):25-31.
 153. Andreoletti O, Berthon P, Levavasseur E, Marc D, Lantier F, Monks E, Elsen JM, Schelcher F. Phenotyping of protein-prion (PrP^{Sc})-accumulating cells in lymphoid and neural tissues of naturally scrapie-affected sheep by double-labeling immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 2002 Oct;50(10):1357-70.
 154. van Keulen LJ, 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.
 155. Diedrich JF, Bendheim PE, Kim YS, Carp RI, Haase AT. Scrapie-associated prion protein accumulates in astrocytes during scrapie infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jan 15;88(2):375-9.
 156. Debeer S, Baron T, Bencsik A. Neuropathological characterisation of French bovine spongiform encephalopathy cases. *Histochem Cell Biol.* 2003 Dec;120(6):513-21.
 157. Miyashita M, Stierstorfer B, Schmahl W. Neuropathological findings in brains of Bavarian cattle clinically suspected of bovine spongiform

REFERÈNCIES

- encephalopathy. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 2004 Jun;51(5):209-15.
158. Jeffrey M, Goodsir CM, Race RE, Chesebro B. Scrapie-specific neuronal lesions are independent of neuronal PrP expression. *Ann Neurol*. 2004 Jun;55(6):781-92.
159. Georgsson G, Gisladdottir E, Arnadottir S. Quantitative assessment of the astrocytic response in natural scrapie of sheep. *J Comp Pathol*. 1993 Apr;108(3):229-40.
160. Brown DR. Microglia and prion disease. *Microsc Res Tech*. 2001 Jul 15;54(2):71-80.
161. Brown DR. Role of the prion protein in copper turnover in astrocytes. *Neurobiol Dis*. 2004 Apr;15(3):534-43.
162. Marella M, Chabry J. Neurons and astrocytes respond to prion infection by inducing microglia recruitment. *J Neurosci*. 2004 Jan 21;24(3):620-7.
163. Moser M, Colello RJ, Pott U, Oesch B. Developmental expression of the prion protein gene in glial cells. *Neuron*. 1995 Mar;14(3):509-17.
164. Brown DR, Besinger A, Herms JW, Kretzschmar HA. Microglial expression of the prion protein. *Neuroreport*. 1998 May 11;9(7):1425-9.
165. Jeffrey M, Goodsir CM, Bruce M, McBride PA, Scott JR, Halliday WG. Correlative light and electron microscopy studies of PrP localisation in 87V scrapie. *Brain Res*. 1994 Sep 12;656(2):329-43.
166. Siso S, Puig B, Varea R, Vidal E, Acin C, Prinz M, Montrasio F, Badiola J, Aguzzi A, Pumarola M, Ferrer I. Abnormal synaptic protein expression and cell death in murine scrapie. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002 Jun;103(6):615-26.
167. Baker CA, Martin D, Manuelidis L. Microglia from Creutzfeldt-Jakob disease-infected brains are infectious and show specific mRNA activation profiles. *J Virol*. 2002 Nov;76(21):10905-13.
168. El Hachimi KH, Chaunu MP, Brown P, Foncin JF. Modifications of oligodendroglial cells in spongiform encephalopathies. *Exp Neurol*. 1998 Nov;154(1):23-30.
169. Spohne I, Fifre A, Koziel V, Kriem B, Oster T, Olivier JL, Pillot T. Oligodendrocytes are susceptible to apoptotic cell death induced by prion protein-derived peptides. *Glia*. 2004 Jul;47(1):1-8.
170. Sayre LM, Perry G, Smith MA. Redox metals and neurodegenerative disease. *Curr Opin Chem Biol*. 1999 Apr;3(2):220-5.
171. Andersen JK. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nat Rev Neurosci*. 2004 Jul;Suppl:S18-25.

REFERÈNCIES

172. Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J Clin Invest.* 2003 Mar;111(6):785-93.
173. Guentchev M, Siedlak SL, Jarius C, Tagliavini F, Castellani RJ, Perry G, Smith MA, Budka H. Oxidative damage to nucleic acids in human prion disease. *Neurobiol Dis.* 2002 Apr;9(3):275-81.
174. Guentchev M, Voigtlander T, Haberler C, Groschup MH, Budka H. Evidence for oxidative stress in experimental prion disease. *Neurobiol Dis.* 2000 Aug;7(4):270-3.
175. Wong BS, Liu T, Li R, Pan T, Petersen RB, Smith MA, Gambetti P, Perry G, Manson JC, Brown DR, Sy MS. Increased levels of oxidative stress markers detected in the brains of mice devoid of prion protein. *J Neurochem.* 2001 Jan;76(2):565-72.
176. White AR, Collins SJ, Maher F, Jobling MF, Stewart LR, Thyer JM, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Prion protein-deficient neurons reveal lower glutathione reductase activity and increased susceptibility to hydrogen peroxide toxicity. *Am J Pathol.* 1999 Nov;155(5):1723-30.
177. Unterberger U, Voigtlander T, Budka H. Pathogenesis of prion diseases. *Acta Neuropathol (Berl).* 2005 Jan;109(1):32-48.
178. Milhavet O, Lehmann S. Oxidative stress and the prion protein in transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Res Brain Res Rev.* 2002 Feb;38(3):328-39.
179. Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull.* 2001 May 15;55(2):133-45.
180. Brown DR, Wong BS, Hafiz F, Clive C, Haswell SJ, Jones IM. Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase. *Biochem J.* 1999 Nov 15;344 Pt 1:1-5.
181. Giese A, Kretzschmar HA. Prion-induced neuronal damage--the mechanisms of neuronal destruction in the subacute spongiform encephalopathies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2001;253:203-17.
182. Kramer ML, Kratzin HD, Schmidt B, Romer A, Windl O, Liemann S, Hornemann S, Kretzschmar H. Prion Protein Binds Copper within the Physiological Concentration Range. *J Biol Chem.* 2001 May 11, 2001;276(20):16711-9.
183. Viles JH, Cohen FE, Prusiner SB, Goodin DB, Wright PE, Dyson HJ. Copper binding to the prion protein: structural implications of four identical cooperative binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 2;96(5):2042-7.

REFERÈNCIES

184. Kawashima T, Doh-ura K, Torisu M, Uchida Y, Furuta A, Iwaki T. Differential expression of metallothioneins in human prion diseases. *Dement Geriatr Cogn Disord*. 2000 Sep-Oct;11(5):251-62.
185. Duguid JR, Bohmont CW, Liu NG, Tourtellotte WW. Changes in brain gene expression shared by scrapie and Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7260-4.
186. Duguid JR, Rohwer RG, Seed B. Isolation of cDNAs of scrapie-modulated RNAs by subtractive hybridization of a cDNA library. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Aug;85(15):5738-42.
187. Sillevis Smitt PA, Blaauwgeers HG, Troost D, de Jong JM. Metallothionein immunoreactivity is increased in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurosci Lett*. 1992 Sep 14;144(1-2):107-10.
188. Hanlon J, Monks E, Hughes C, Weavers E, Rogers M. Metallothionein in bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol*. 2002 Nov;127(4):280-9.
189. Yamaguchi Y. Lecticans: organizers of the brain extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*. 2000 Feb;57(2):276-89.
190. Bandtlow CE, Zimmermann DR. Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80(4):1267-90.
191. Bruckner G, Hartig W, Kacza J, Seeger J, Welt K, Brauer K. Extracellular matrix organization in various regions of rat brain grey matter. *J Neurocytol*. 1996 May;25(5):333-46.
192. Hartig W, Brauer K, Bruckner G. Wisteria floribunda agglutinin-labelled nets surround parvalbumin-containing neurons. *Neuroreport*. 1992 Oct;3(10):869-72.
193. Wegner F, Hartig W, Bringmann A, Grosche J, Wohlfarth K, Zuschratter W, Bruckner G. Diffuse perineuronal nets and modified pyramidal cells immunoreactive for glutamate and the GABA(A) receptor alpha1 subunit form a unique entity in rat cerebral cortex. *Exp Neurol*. 2003 Dec;184(2):705-14.
194. Celio MR, Blumcke I. Perineuronal nets--a specialized form of extracellular matrix in the adult nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 1994 Jan;19(1):128-45.
195. Belichenko PV, Miklossy J, Belser B, Budka H, Celio MR. Early destruction of the extracellular matrix around parvalbumin-immunoreactive interneurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis*. 1999 Aug;6(4):269-79.

REFERÈNCIES

196. Hilbig H, Bidmon HJ, Blohm U, Zilles K. Wisteria floribunda agglutinin labeling patterns in the human cortex: a tool for revealing areal borders and subdivisions in parallel with immunocytochemistry. *Anat Embryol (Berl)*. 2001 Jan;203(1):45-52.
197. Caughey B, Brown K, Raymond GJ, Katzenstein GE, Thresher W. Binding of the protease-sensitive form of PrP (prion protein) to sulfated glycosaminoglycan and congo red [corrected]. *J Virol*. 1994 Apr;68(4):2135-41.
198. Simoneau S, Haik S, Leucht C, Dormont D, Deslys JP, Weiss S, Lasmezas C. Different isoforms of the non-integrin laminin receptor are present in mouse brain and bind PrP. *Biol Chem*. 2003 Feb;384(2):243-6.
199. Snow AD, Kisilevsky R, Willmer J, Prusiner SB, DeArmond SJ. Sulfated glycosaminoglycans in amyloid plaques of prion diseases. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1989;77(4):337-42.
200. Snow AD, Wight TN, Nochlin D, Koike Y, Kimata K, DeArmond SJ, Prusiner SB. Immunolocalization of heparan sulfate proteoglycans to the prion protein amyloid plaques of Gerstmann-Straussler syndrome, Creutzfeldt-Jakob disease and scrapie. *Lab Invest*. 1990 Nov;63(5):601-11.
201. McBride PA, Wilson MI, Eikelenboom P, Tunstall A, Bruce ME. Heparan sulfate proteoglycan is associated with amyloid plaques and neuroanatomically targeted PrP pathology throughout the incubation period of scrapie-infected mice. *Exp Neurol*. 1998 Feb;149(2):447-54.
202. Horonchik L, Tzaban S, Ben-Zaken O, Yedidia Y, Rouvinski A, Papy-Garcia D, Barritault D, Vlodavsky I, Taraboulos A. Heparan sulfate is a cellular receptor for purified infectious prions. *J Biol Chem*. 2005 Jan 24.
203. Wong C, Xiong LW, Horiuchi M, Raymond L, Wehrly K, Chesebro B, Caughey B. Sulfated glycans and elevated temperature stimulate PrP(Sc)-dependent cell-free formation of protease-resistant prion protein. *Embo J*. 2001 Feb 1;20(3):377-86.
204. Deutch AY, Roth RH. Neurotransmitters. In: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, editors. *Fundamental Neuroscience*. Second ed. San Diego: Academic Press; 2003. p. 163-96.
205. Brady S, Colman DR, Brophy P. Subcellular Organization of the nervous system: Organelles and their functions. In: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, editors. *Fundamental Neuroscience*. Second ed. San Diego: Academic Press; 2003. p. 79-114.

REFERÈNCIES

206. Sudhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 2004;27:509-47.
207. Ferrer I, Costa F, Grau Veciana JM. Creutzfeldt-Jacob disease: a golgi study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 1981 May-Jun;7(3):237-42.
208. Ferrer I, Kulisevski J, Vazquez J, Gonzalez G, Pineda M. Purkinje cells in degenerative diseases of the cerebellum and its connections: a Golgi study. *Clin Neuropathol.* 1988 Jan-Feb;7(1):22-8.
209. Brown DR. Prion and prejudice: normal protein and the synapse. *Trends Neurosci.* 2001 Feb;24(2):85-90.
210. Kitamoto T, Shin RW, Doh-ura K, Tomokane N, Miyazono M, Muramoto T, Tateishi J. Abnormal isoform of prion proteins accumulates in the synaptic structures of the central nervous system in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Am J Pathol.* 1992 Jun;140(6):1285-94.
211. Ferrer I. Synaptic pathology and cell death in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Cerebellum.* 2002 Jul;1(3):213-22.
212. Ferrer I, Puig B, Blanco R, Marti E. Prion protein deposition and abnormal synaptic protein expression in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neuroscience.* 2000;97(4):715-26.
213. Ferrer I, Rivera R, Blanco R, Marti E. Expression of proteins linked to exocytosis and neurotransmission in patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiol Dis.* 1999 Apr;6(2):92-100.
214. Jeffrey M, Halliday WG, Bell J, Johnston AR, MacLeod NK, Ingham C, Sayers AR, Brown DA, Fraser JR. Synapse loss associated with abnormal PrP precedes neuronal degeneration in the scrapie-infected murine hippocampus. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000 Feb;26(1):41-54.
215. Russelakis-Carneiro M, Hetz C, Maundrell K, Soto C. Prion replication alters the distribution of synaptophysin and caveolin 1 in neuronal lipid rafts. *Am J Pathol.* 2004 Nov;165(5):1839-48.
216. Belichenko PV, Brown D, Jeffrey M, Fraser JR. Dendritic and synaptic alterations of hippocampal pyramidal neurones in scrapie-infected mice. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2000 Apr;26(2):143-9.
217. Siso S, Ordoñez M, Cordón I, Vidal E, Pumarola M. Distribution of PrPresin the brains of BSE-affected cows detected by active surveillance in Catalonia, Spain. *Vet Rec.* 2004 october 23 2004;155:524-5.
218. Oppenheim RW, Johnson JE. Programmed Cell Death and Neurotrophic Factors. In: Squire LR, Bloom FE, McConnell SK, Roberts JL, Spitzer NC, Zigmond MJ, editors. *Fundamental Neuroscience.* Second ed. San Diego: Academic Press; 2003. p. 163-96.

REFERÈNCIES

219. Liberski PP, Sikorska B, Bratosiewicz-Wasik J, Carleton Gajdusek D, 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.
220. Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3155-62.
221. Jeffrey M, Halliday WG. Numbers of neurons in vacuolated and non-vacuolated neuroanatomical nuclei in bovine spongiform encephalopathy-affected brains. *J Comp Pathol.* 1994 Apr;110(3):287-93.
222. Giese A, Groschup MH, Hess B, Kretzschmar HA. Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis. *Brain Pathol.* 1995 Jul;5(3):213-21.
223. Lucassen PJ, Williams A, Chung WC, Fraser H. Detection of apoptosis in murine scrapie. *Neurosci Lett.* 1995 Oct 6;198(3):185-8.
224. Williams A, Lucassen PJ, Ritchie D, Bruce M. PrP deposition, microglial activation, and neuronal apoptosis in murine scrapie. *Exp Neurol.* 1997 Apr;144(2):433-8.
225. Kretzschmar HA, Giese A, Brown DR, Herms J, Keller B, Schmidt B, Groschup M. Cell death in prion disease. *J Neural Transm Suppl.* 1997;50:191-210.
226. Jamieson E, Jeffrey M, Ironside JW, Fraser JR. Apoptosis and dendritic dysfunction precede prion protein accumulation in 87V scrapie. *Neuroreport.* 2001 Jul 20;12(10):2147-53.
227. Theil D, Fatzer R, Meyer R, Schobesberger M, Zurbriggen A, Vandeveld M. Nuclear DNA fragmentation and immune reactivity in bovine spongiform encephalopathy. *J Comp Pathol.* 1999 Nov;121(4):357-67.
228. Fairbairn DW, Carnahan KG, Thwaites RN, Grigsby RV, Holyoak GR, O'Neill KL. Detection of apoptosis induced DNA cleavage in scrapie-infected sheep brain. *FEMS Microbiol Lett.* 1994 Jan 15;115(2-3):341-6.
229. Jesionek-Kupnicka D, Buczynski J, Kordek R, Sobow T, Kloszewska I, Papierz W, Liberski PP. Programmed cell death (apoptosis) in Alzheimer's disease and Creutzfeldt-Jakob disease. *Folia Neuropathol.* 1997;35(4):233-5.
230. Pillot T, Drouet B, Pincon-Raymond M, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Chambaz J. A nonfibrillar form of the fusogenic prion protein fragment [118-135] induces apoptotic cell death in rat cortical neurons. *J Neurochem.* 2000 Dec;75(6):2298-308.

REFERÈNCIES

231. Ferrer I. Nuclear DNA fragmentation in Creutzfeldt-Jakob disease: does a mere positive in situ nuclear end-labeling indicate apoptosis? *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999 Jan;97(1):5-12.
232. Jeffrey M, Scott JR, Williams A, Fraser H. Ultrastructural features of spongiform encephalopathy transmitted to mice from three species of bovidae. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1992;84(5):559-69.
233. Liberski PP, Budka H. Ultrastructural pathology of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease. *Ultrastruct Pathol*. 1995 Jan-Feb;19(1):23-36.
234. Liberski PP, Gajdusek DC, Brown P. How do neurons degenerate in prion diseases or transmissible spongiform encephalopathies (TSEs): neuronal autophagy revisited. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2002;62(3):141-7.
235. Liberski PP, Yanagihara R, Gibbs CJ, Jr., Gajdusek DC. Neuronal autophagic vacuoles in experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1992;83(2):134-9.
236. Jeffrey M, Goodbrand IA, Goodsir CM. Pathology of the transmissible spongiform encephalopathies with special emphasis on ultrastructure. *Micron*. 1995;26(3):277-98.
237. Ferrer I, Casas R, Rivera R. Parvalbumin-immunoreactive cortical neurons in Creutzfeldt-Jakob disease. *Ann Neurol*. 1993 Dec;34(6):864-6.
238. Guentchev M, Hainfellner JA, Trabattoni GR, Budka H. Distribution of parvalbumin-immunoreactive neurons in brain correlates with hippocampal and temporal cortical pathology in Creutzfeldt-Jakob disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997 Oct;56(10):1119-24.
239. Guentchev M, Wanschitz J, Voigtlander T, Flicker H, Budka H. Selective neuronal vulnerability in human prion diseases. Fatal familial insomnia differs from other types of prion diseases. *Am J Pathol*. 1999 Nov;155(5):1453-7.
240. Guentchev M, Groschup MH, Kordek R, Liberski PP, Budka H. Severe, early and selective loss of a subpopulation of GABAergic inhibitory neurons in experimental transmissible spongiform encephalopathies. *Brain Pathol*. 1998 Oct;8(4):615-23.
241. Bouzamondo E, Milroy AM, Ralston HJ, 3rd, Prusiner SB, DeArmond SJ. Selective neuronal vulnerability during experimental scrapie infection: insights from an ultrastructural investigation. *Brain Res*. 2000 Aug 25;874(2):210-5.

REFERÈNCIES

242. Brown D, Belichenko P, Sales J, Jeffrey M, Fraser JR. Early loss of dendritic spines in murine scrapie revealed by confocal analysis. *Neuroreport*. 2001 Jan 22;12(1):179-83.
243. Bouzamondo-Bernstein E, Hopkins SD, Spilman P, Uyehara-Lock J, Deering C, Safar J, Prusiner SB, Ralston HJ, 3rd, DeArmond SJ. The neurodegeneration sequence in prion diseases: evidence from functional, morphological and ultrastructural studies of the GABAergic system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2004 Aug;63(8):882-99.
244. Ligios C, Jeffrey M, Ryder SJ, Bellworthy SJ, Simmons MM. Distinction of scrapie phenotypes in sheep by lesion profiling. *J Comp Pathol*. 2002 Jul;127(1):45-57.
245. McGill IS, Wells GA. Neuropathological findings in cattle with clinically suspect but histologically unconfirmed bovine spongiform encephalopathy (BSE). *J Comp Pathol*. 1993 Apr;108(3):241-60.
246. Wells GA, Hancock RD, Cooley WA, Richards MS, Higgins RJ, David GP. Bovine spongiform encephalopathy: diagnostic significance of vacuolar changes in selected nuclei of the medulla oblongata. *Vet Rec*. 1989 Nov 18;125(21):521-4.
247. Wells GA, Hawkins SA, Green RB, Austin AR, Dexter I, Spencer YI, Chaplin MJ, Stack MJ, Grimo M, Dawson M. Preliminary observations on the pathogenesis of experimental bovine spongiform encephalopathy (BSE): an update. *Vet Rec*. 1998 Jan 31;142(5):103-6.
248. Notari S, Capellari S, Giese A, Westner I, Baruzzi A, Ghetti B, Gambetti P, Kretzschmar HA, Parchi P. Effects of different experimental conditions on the PrPSc core generated by protease digestion: implications for strain typing and molecular classification of CJD. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):16797-804.
249. Bruce ME, Boyle A, Cousens S, McConnell I, Foster J, Goldmann W, Fraser H. Strain characterization of natural sheep scrapie and comparison with BSE. *J Gen Virol*. 2002 Mar;83(Pt 3):695-704.
250. DeArmond SJ, Prusiner SB. Etiology and pathogenesis of prion diseases. *Am J Pathol*. 1995 Apr;146(4):785-811.
251. Groschup MH, Beekes M, McBride PA, Hardt M, Hainfellner JA, Budka H. Deposition of disease-associated prion protein involves the peripheral nervous system in experimental scrapie. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999 Nov;98(5):453-7.
252. Wells GA. Pathogenesis of BSE. *Vet Res Commun*. 2003 Oct;27 Suppl 1:25-8.

REFERÈNCIES

253. Wang K, Bekar LK, Furber K, Walz W. Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res.* 2004 Oct 22;1024(1-2):193-202.
254. Brown DR, Kretzschmar HA. Microglia and prion disease: a review. *Histol Histopathol.* 1997 Jul;12(3):883-92.
255. Marella M, Gaggioli C, Batoz M, Deckert M, Tartare-Deckert S, Chabry J. Pathological Prion Protein Exposure Switches on Neuronal Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Resulting in Microglia Recruitment. *J Biol Chem.* 2005 Jan 14;280(2):1529-34.
256. Hidalgo J, Penkowa M, Giralt M, Carrasco J, Molinero A. Metallothionein expression and oxidative stress in the brain. *Methods Enzymol.* 2002;348:238-49.
257. Diedrich J, Wietgreffe S, Haase A, Duguid J, Carp RI. Identifying and mapping changes in gene expression involved in the neuropathology of scrapie and Alzheimer's disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1991;172:259-74.
258. Puig B, Ferrer I. Cell death signaling in the cerebellum in Creutzfeldt-Jakob disease. *Acta Neuropathol (Berl).* 2001 Sep;102(3):207-15.
259. Leist M, Nicotera P. Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res.* 1998 Mar 15;239(2):183-201.
260. Moya KL, Sales N, Hassig R, Creminon C, Grassi J, Di Giamberardino L. Immunolocalization of the cellular prion protein in normal brain. *Microsc Res Tech.* 2000 Jul 1;50(1):58-65.
261. Ligios C, Dexter G, Spiropoulos J, Maestrone C, Carta A, Simmons MM. Distribution of vascular amyloid in scrapie-affected sheep with different genotypes. *J Comp Pathol.* 2004 Nov;131(4):271-6.
262. Martin S, Gonzalez L, Chong A, Houston FE, Hunter N, Jeffrey M. Immunohistochemical characteristics of disease-associated PrP are not altered by host genotype or route of inoculation following infection of sheep with bovine spongiform encephalopathy. *J Gen Virol.* 2005 Mar;86(Pt 3):839-48.
263. Jeffrey M, Goodsir CM, Holliman A, Higgins RJ, Bruce ME, McBride PA, Fraser JR. Determination of the frequency and distribution of vascular and parenchymal amyloid with polyclonal and N-terminal-specific PrP antibodies in scrapie-affected sheep and mice. *Vet Rec.* 1998 May 16;142(20):534-7.
264. McDonald TJ, Li C, Wasserman RH. Distribution of calbindin-D28K in the brain of the fetal sheep in late gestation. *Brain Res.* 1995 Mar 27;675(1-2):303-15.

REFERÈNCIES

265. Oswald MJ, Kay GW, Palmer DN. Changes in GABAergic neuron distribution in situ and in neuron cultures in ovine (OCL6) Batten disease. *Eur J Paediatr Neurol.* 2001;5 Suppl A:135-42.
266. Murakami T, Ohtsuka A, Su WD, Taguchi T, Oohashi T, Murakami T, Abe K, Ninomiya Y. The extracellular matrix in the mouse brain: its reactions to endo-alpha-N-acetylgalactosaminidase and certain other enzymes. *Arch Histol Cytol.* 1999 Aug;62(3):273-81.

ABSTRACT

ABSTRACT

Study of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie pathogenesis in field cases.

The brains of BSE field cases in cattle were collected after diagnosis within the active surveillance programme in Catalonia. First of all a characterisation of the samples was carried out. By studying the brain distribution of the resistant prion protein (PrPres) deposition with western blotting and a luminescence immunosorbent assay a brain PrPres distribution curve (BPDC) was obtained along with lesion and immunohistochemical brain profiles. These yielded information regarding the stage of the disease of the cases which were classified as early cases due to the lack of reported clinical signs and the small extent of the lesion. The in-depth study of PrPres deposition patterns disclosed interesting information on the involvement of glial population in the spread of PrPres.

To further characterise the cases a molecular profile of the deposited PrPres in all TSE cases diagnosed in Catalonia was also obtained. A densitometric determination of the glycosylation pattern and of the molecular weight of the deglycosylated PrPres and the differential affinity to 6H4 and P4 monoclonal antibodies were the tools employed. All cases studied fitted into the classical TSE descriptions, thus allowing us to discard the presence of atypical TSE strains among the pool of cases detected through the active surveillance programme.

Other pathogenetic mechanisms were then investigated in some of the BSE brains by means of immunohistochemical and histochemical approaches. Glial cell reaction (immunohistochemistry to detect astrocytes against glial fibrillary acidic protein and vimentin and histochemistry for microglia with *Griffonia simplicifolia* lectin), synaptic protein alterations (IHC against synaptophysin and SNAP25 synaptic proteins), perineuronal nets disruption (HC with *Wysteria floribunda* agglutinin), presence of oxidative stress phenomena (IHC against Methallotioneins I+II and Nitrotyrosine) and cell death (IHC against cleaved Caspase 3) were the parameters evaluated. Of special interest was the study of these cases since they were in early stages of the neurodegeneration.

A group of scrapie, clinically terminal, field cases was also studied. After profiling the lesions and PrPsc distribution, a study of the GABAergic populations was carried out by evaluating the immunolabelling of the calcium binding proteins: parvalbumin and calbindin D28k. An important reduction of the parvalbumin signalling was observed, mainly affecting neuronal prolongations. Despite of that, no alteration of the perineuronal nets (studies with HC with *Wysteria floribunda* agglutinin) was detected. This alteration was concomitant to a mild level of spongyform lesion and an evident deposit of PrPres and could partially be an explanation of the clinical signs observed in the animals such as tremors or hyperexcitability.

AGRAÏMENTS

A G R A Ï M E N T S

Costa de creure que m'hagi arribat el moment d'escriure aquestes línies. Fer-ho, significa moltes coses: l'inevitable pas dels anys i l'acompliment d'objectius fixats ja fa molt de temps. Significa que he recorregut un camí, i això no hauria estat possible sense l'ajut, suport o companyia de qui, en aquest parell de planes, pretenc reconèixer. Espero no deixar-me a ningú i, si fos així, demano disculpes.

Vull començar per agrair al departament d'agricultura ramaderia i pesca (DARP) i, sobre tot, al departament de salut (DS) de la Generalitat de Catalunya ja que sense el seu finançament aquest estudi no hauria estat possible. Al laboratori PRIOCAT, al centre de recerca en sanitat animal (CReSA) i a la Facultat de veterinària de la UAB per ser la infraestructura que ha permès canalitzar aquest finançament. També vull reconèixer el suport econòmic dels projectes de recerca del MCyT i el FEDER EET2001-4814-C02-02, del MCyT Ref. ET2002-05168-C04-01 i del projecte europeu FAIRJ-CT 98-6022 dins del qual vaig gaudir d'una beca d'investigació entre gener de 2001 i novembre de 2002.

La col·laboració i disponibilitat del personal del DS, dels serveis veterinaris oficials, dels laboratoris de diagnòstic, del personal dels serveis territorials de salut i també del servei de sanitat animal del DARP. Agrair també les atencions del personal dels escorxadors: Càrniques de la Vall d'en Bas, Frigorífics de Cornellà, Carnissers d'Osona, Escorxador Valira, Escorxador de Sabadell i Escorxador Vinyals i Soler.

Al servei d'idiomes moderns de la UAB, al servei d'estadística de la UAB, al gabinet de llengua catalana de la UAB i al Tom Yohannan.

A los compañeros del CNREETs de Zaragoza, por compartir vuestro camino con nosotros y por vuestra confianza. Un besote para ti, Rosita.

A les noies del Laboratori de Bellvitge i a tu, Isidre, per ser un referent excepcional.

To Prionics A.G., particularly to Thomas and Alex, thanks for your trust and enthusiasm.

A tots el companys/es del CReSA: el vostre futur brilla amb llum pròpia i m'energulleixo d'haver format part d'aquest projecte!

Als companys/es d'anatomia patològica. Als patòlegs "vells" gràcies per ensenyar-me i per la vostra paciència. Als molts companys que he conegut entre aquestes parets, pels moments compartits... la llista de noms ocuparia massa espai! I a la gent del laboratori i la sala de necros, i a tu Mar, gràcies per estar allí sempre preparats per respondre qualsevol pregunta. I a la gent

AGRAÏMENTS

del departament i de la facultat disposats sempre a donar un cop de ma, especialment a la gent de bioquímica i de fisiologia.

Al grup de Neuro: Anna, Lola, Carme, Anna... Gràcies, Jose, per compartir la teva saviesa. Merce, tocina! Tu positividad ha sido el mejor estímulo. A tu Raül, no canviïs, espero poder seguir al teu costat i estar a la teva altura. A l'Iván, la Montse, l'Anna M^a i a la Sílvia, gràcies per aplanar-me el camí, encantat d'haver compartit tants moments, bons i dolents, amb vosaltres. I sobretot a les meves nenes Sierra i Marta: gràcies per ajudar-me, per creure en mi i per aguantar la meva mala llet. Vosaltres sou el ciment d'aquesta tesi. Sier, perdona mis rollos y gracias por enseñarme a vivir.

Al *cuore*: Mariona, Pat, Marta, Lela i Max i també a vosaltres Nyosep i Mernyè, Taqui, Sue, Ix, Tania i Cris. Sense vosaltres mai hauria pogut tirar endavant. A tí Antxon por darme tu luz y convertir los fines de semana en un santuario, aunque no sea en negrita estaré orgulloso de aparecer en tus memorias. Carles i Victor, perdoneu-me els mals moments que us he fet passar i gràcies per veure en mi allò que a mi se m'escapa.

A la meva família, per que sempre esteu aquí. Pare, mare m'heu ensenyat a sortir-me'n. Confio en que sabreu fer-ho vosaltres també, seré al vostre costat. Avis Àngel i Eulàlia sou admirables, àvia, gràcies per donar-me la teva alegria i més amor del que és possible. Avis Feliu i Maria, allà on sigueu, gràcies també! I a la resta... no teniu pèrdua! Pere i Uri: tontus! Sempre sereu els meus nens!

I em reservo pel final l'agraïment al principal culpable de tot això. Martí, no tinc paraules.

Per acabar vull aprofitar que aquestes pàgines de la tesi se les llegeix gairebé tothom que l'acaba tenint entre mans per demanar la igualtat de drets al món. Per que tots hem de tenir les mateixes oportunitats, arreu, i independentment de la nostra raça, gènere o la nostra identitat sexual.

PAU!

Enric Vidal Barba

ABREVIACIONS

Abreviació	Complet
ATP	Adenina trifosfat
ATPasa	Adenina trifosfatasa
BPDC	Corba encefàlica de distribució de la PrPres
BTAC	Banc de teixits animals de Catalunya
CBP	Proteïnes lligadores de calci
cDNA	Àcid desoxirribonucleic complementari
CFD	Cel·lules fol·liculars dendrítiques
CNREETS	Centro nacional de referencia de las EETs
CReSA	Centre de recerca en sanitat animal
CSPGs	Condroitin sulfat proteoglicans
CWD	Malaltia caquèctitzant crònica (Chronic wasting disease)
EEB	Encefalopatia espongiforme bovina
EEF	Encefalopatia espongiforme felina
EETs	Encefalopaties espongiformes transmissibles
ETV	Encefalopatia transmissible del visó
FGF	Factor de creixement de fibroblasts
GABA	Àcid gamma amino butíric
GAG	Glucosaminoglicans
GALT	Teixit limfoide associat a l'intestí
GFAP	Proteïna àcida fibril·lar glial
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GSH	Glutatió
GSS	Síndrome de Gerstmann Straussler Scheinker
HIV	Virus de la immunodeficiència humana
HSPG	Heparan sulfat proteoglicans
IFF	Insomni fatal familiar
IHQ	Immunohistoquímica
ILGFR	Receptor del factor de creixement del tipus insulina
KO	<i>Knock out</i>
LGS	Lectina de <i>Griffonia simplicifolia</i>
LIA	Assaig immunosrovent de luminiscència
MCJ	Malaltia de Creutzfeldt Jakob
MCP	Mort cel·lular programada
MER	Material especificat de risc
MET	Microscòpia electrònica de transmissió
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MT I+II	Metal·lotioneïnes I+II
N-CAM	Molècula d'adhesió cel·lular neuronal
NO	Òxid nítric
NOS	Sintasa d'òxid nítric
NRT	Nucli reticular talàmic
NSF	Factor sensible a N-etilmaleïmida soluble
PK	Proteïnasa K
PMCA	<i>Protein misfolding cyclic amplification</i> (Amplificació cíclica del malplegament proteic)
PrPc	Proteïna prió cel·lular
PrPres	Proteïna prió resistent
PV	Parvalbúmina
ROS	Èspècies reactives d'oxigen
SAF	Fibril·les associades a Scrapie
SIDA	Síndrome d'immunodeficiència adquirida
SNAP 25	Proteïna de 25 kD associada a a sinaptosoma
SNARE	Receptor de proteïnes SNAP o NSF
SNC	Sistema nerviós central
SOD	Superòxid dismutasa
TNFR	Receptor del factor de necrosi tumoral
TO	Tremolor Ovina o en anglès: <i>scrapie</i>
UE	Unió Europea
UV	Ultravioleta
VAMP	Proteïna de membrana associada a vèssicula
VIM	Vimentina
vMCJ	Variant de la Malaltia de Creutzfeldt Jakob
WB	Transferència Western (<i>Western blotting</i>)
WFA	Agglutinina de <i>Wysteria floribunda</i>



Treball realitzat al laboratori PRIOCAT
del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA).