

# **Estudio de la uroporfirina I como aproximación terapéutica frente a las encefalopatías espongiiformes transmisibles**

**SANDRA GARCÍA MARTÍNEZ**

**LEIOA, 2020**

Tesis doctoral

# Estudio de la uroporfirina I como aproximación terapéutica frente a las encefalopatías espongiiformes transmisibles

SANDRA GARCÍA MARTÍNEZ

LEIOA, 2020

**DIRECTORES:**

**Dr. Joaquín Castilla Castrillón**

**Dr. Ganeko Bernardo Seisedos**

**TUTOR:**

**Dr. Carlos Matute Almu**

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

- $\mu\text{g}$ : microgramo
- $\mu\text{l}$ : microlitro
- $\mu\text{m}$ : micrómetro
- nm: nanómetro
- $\Omega$ : ohmios
- $^{\circ}\text{C}$ : grado centígrado
- 12B2: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 12B2
- 22L: cepa priónica de *scrapie* adaptado a ratón
- 301C: cepa priónica de BSE adaptada a ratón
- 3F4: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 3F4
- 6C2: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado 6C2

### A

- AFM: microscopía electrónica de fuerza atómica, del inglés, *atomic force microscopy*
- ASO: oligonucleótido antisentido, del inglés, *Antisense Oligonucleotide*

### B

- Bar 224: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado Bar 224
- BSE: del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*

### C

- CC: del inglés, *charged cluster*
- CD: del inglés, *Circular Dichroism*
- CD1: modelo animal de genotipo silvestre
- CEP: en inglés, *Congenital Erythropoietic Porphyria*
- CJD: del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*
- cm: centímetro
- CMV: cytomegalovirus
- compB: compuesto inhibidor, del inglés, *compound B*,
- cryoEM: criomicroscopía electrónica
- C-terminal: extremo carboxilo terminal
- CWD: del inglés, *Chronic Wasting Disease*

### D

- Da: dalton
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DNAsa: deoxirribonucleasa

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

- dNTP: del inglés, *deoxynucleotide triphosphates*
- DO<sub>600</sub>: densidad óptica a 600nm
- DMEM: del inglés, *Dulbecco's Modified Eagle medium*
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- DY: *Drowsy*, cepa de prion de hámster

### E

- *E. coli*: *Escherichia coli*,
- EDTA: etilendiaminotetraacético
- EET: encefalopatía espongiiforme transmisible
- EGCG: del inglés, *epigallocatechin Gallate*

### F

- F: del inglés, *forward*
- FBS: del inglés, *fetal bovine serum*
- FFI: del inglés, *fatal familial insomnia*
- FSE: del inglés, *feline spongiform encephalopathy*
- FTIR: del inglés, *fourier transform infrared spectroscopy*

### G

- *g*: fuerza centrífuga relativa
- GADD34: del inglés *growth arrest and DNA damage–inducible 34*
- gCJD: del inglés, *genetic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- GPI: del inglés, *glycosylphosphatidylinositol*
- GSS: *Gerstmann-Sträussler-Scheinker*
- GFAP: del inglés, *Glial Fibrillary Acidic Protein*
- Gdn-HCl: hidrocloreuro de guanidinio

### H

- h: hora
- HC: del inglés, *hydrofobic core*
- HE: heterocigoto
- HO: homocigoto
- HPLC: del inglés, *high performance liquid chromatography*
- HPLC/FL: del inglés *high performance liquid chromatography- Fluorimetric Detector*
- HXMS: del inglés, *hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry*
- HY: *Hyper*, cepa de prión de hámster

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

### I

- IC50: del inglés, *half maximal inhibitory concentration*
- iCJD: del inglés, *iatrogenic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- ICSM: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado ICSM
- IF2 $\alpha$ : del inglés, *eukaryotic translation initiation factor 2*
- IHQ: inmunohistoquímica
- IMDM: del inglés, *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*
- IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopirósido
- ISR: del inglés, *integrated stress response*
- ISRIB: compuesto que inhibe la ISR
- ITC: del inglés, *isothermal titration calorimetry*

### K

- kDa: kilodalton
- Kd: Constante de afinidad
- KO: animal transgénico que no expresa un determinado gen
- KO-PrP: animal transgénico que no expresa el gen que codifica la PrP

### L

- LB: Luria Bertoni, medio de cultivo de bacterias
- LCP: del inglés, *Luminiscent Conjugated Polythiophenes*

### M

- M: molar
- MD: del inglés, *Molecular Dynamics*
- mg: miligramo
- min: minuto
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- MTT: bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio

### N

- ng: nanogramo
- nm: nanómetro
- N-terminal: extremo amino terminal

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

- Nor98: cepa de prion ovino atípica
- N2a: línea celular de neuroblastoma de ratón

### O

- OPRI: del inglés, *octapeptide repeat insertions*
- ORF: marco de lectura abierto, del inglés, *open reading frame*
- OR: octa repeticiones, del inglés, *octapeptide repeats*

### P

- p/v: peso/volumen
- PBS: del inglés, *phosphate buffered saline*
- PCR: del inglés, *polymerase chain reaction*
- Pe: permeabilidad endotelial
- PERK: del inglés, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
- PIRIBS: modelo de hoja- $\beta$  paralela en registro
- PK: proteinasa K
- PM: marcador de peso molecular
- PMCA: del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*
- PMSA: del inglés, *Protein Misfolding Shaking Amplification*
- PMSF: fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- PPS: del inglés, pentosan polysulfate
- PRN100: anticuerpo monoclonal humanizado anti-PrP<sup>C</sup> denominado PRN100
- *PRNP*: gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*<sup>-/-</sup>: animal transgénico KO para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*<sup>+/-</sup>: animal transgénico hemocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- *PRNP*<sup>+/+</sup>: animal transgénico homocigoto para el gen que codifica la proteína PrP
- PrP: proteína del prion, del inglés, *Prion protein*
- PrP\*: PrP en un estado conformacional transitorio, intermedio entre PrP<sup>C</sup> y PrP<sup>Sc</sup>
- PrP<sup>27-30</sup>: PrP resistente a PK de 27-30 kDa
- PrP<sup>C</sup>: isoforma celular de PrP, del inglés, *cellular prion protein*
- PrP<sup>res</sup>: PrP resistente a la digestión con PK
- PrP<sup>Sc</sup>: isoforma patógena de PrP, del inglés, *Scrapie associated Prion Protein*
- PTA: del inglés, *phosphotungstic acid*
- PVDF: polifluoruro de vinilideno

### Q

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

- QUIC: del inglés, *quaking induced conversion*

### R

- R: del inglés, *reverse*
- RE: retículo endoplasmático
- recPrP: PrP recombinante
- RML: cepa de prion ovino adaptado a ratón en el *Rocky Mountain Laboratory*
- RNA: ácido ribonucleico
- RNAi: ácido ribonucleico de interferencia
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero
- rpm: revoluciones por minuto
- RMN: resonancia magnética nuclear
- RT-QuIC: del inglés, *Real Time - Quaking Induced Conversion*

### S

- s: segundo
- SAF: del inglés, *scrapie associated fibrils*
- Saf 83: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado Saf 83
- sCJD: del inglés, *sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease*
- SD: del inglés, *standard deviation*
- SDS-PAGE: del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- sFI: del inglés, *sporadic fatal insomnia*
- Sha 31: anticuerpo monoclonal anti-PrP denominado Sha 31
- SNC: sistema nervioso central
- SPR: del inglés, *surface plasmon resonance*

### T

- Tris-HCl: tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreuro
- TEER: del inglés, *transendothelial electrical resistance*
- TEM: microscopía electrónica de transmisión, del inglés, *transmission electron microscopy*
- ThT: del inglés, *Thioflavine T*
- TME: del inglés, *Transmissible Mink Encephalopathy*
- TMPyP-Fe(III): del inglés, *Iron (III) meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl)porphine*

### U

- UROIII: enzima uroporfirinógeno III sintasa
- URO I: uroporfirina I

## ABREVIATURAS/GLOSARIO

- UPR: del inglés, *unfolded protein response*
- UPS: del inglés, *ubiquitin proteasome system*
- UV: radiación ultravioleta

### V

- v/v: volumen/volumen
- vCJD: del inglés, *variant Creutzfeldt-Jakob Disease*
- VPSPr: del inglés, *Variably Protease-Sensitive Prionopathy*

### W

- WT: del inglés, *wild - type*

**Tabla de los 20 aminoácidos junto con su abreviatura y código**

Nombre de aminoácido	Abreviatura	Código	Nombre de aminoácido	Abreviatura	Código
Alanina	Ala	A	Leucina	Leu	L
Arginina	Arg	R	Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N	Metionina	Met	M
Ácido aspártico	Asp	D	Fenilalanina	Phe	F
Cisteína	Cys	C	Prolina	Pro	P
Glutamina	Gln	Q	Serina	Ser	S
Ácido glutámico	Glu	E	Treonina	Thr	T
Glicina	Gly	G	Triptófano	Trp	W
Histidina	His	H	Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I	Valina	Val	V

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>ABREVIATURAS/GLOSARIO.....</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>15</b>
<b>RESUMEN/SUMMARY .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>22</b>
<b>1 ¿Qué son las encefalopatías espongiformes transmisibles? .....</b>	<b>23</b>
1.1 Antecedentes históricos .....	24
1.2 Descubrimiento del agente causal .....	25
1.3 Hipótesis de “solo proteína” .....	27
1.4 Fundamentos moleculares de la hipótesis de “solo proteína” .....	28
1.5 Modelos <i>in vivo</i> que avalan la hipótesis de “solo proteína” .....	29
1.6 Modelos <i>in vitro</i> que avalan la hipótesis de “solo proteína” .....	30
1.7 La hipótesis de “solo proteína” en la actualidad.....	32
<b>2 Bioquímica del agente causal .....</b>	<b>33</b>
2.1 PrP <sup>C</sup> .....	33
2.2 Mecanismo de malplegamiento a PrP <sup>Sc</sup> .....	36
2.3 PrP <sup>Sc</sup> .....	40
2.4 Fenómeno de cepa .....	43
2.5 Barrera de transmisión .....	44
2.6 Patogenia .....	45
<b>3 Encefalopatías espongiformes transmisibles humanas.....</b>	<b>49</b>
3.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles genéticas.....	50
3.2 Enfermedades espongiformes transmisibles adquiridas .....	52
3.3 Encefalopatías espongiformes transmisibles esporádicas.....	53
<b>4 Modelos utilizados en el estudio de las EET.....</b>	<b>55</b>
4.1 Modelos <i>in vitro</i> de propagación de priones .....	55
4.2 Modelos <i>in vivo</i> de propagación de priones .....	58
<b>5 Estrategias terapéuticas .....</b>	<b>60</b>
5.1 Estrategias basadas en inmunoterapia .....	61
5.2 Estrategias basadas en la disminución de la PrP <sup>C</sup> .....	62
5.3 Estrategias basadas en la eliminación de la PrP <sup>Sc</sup> .....	62
5.4 Estrategias dirigidas a evitar la conversión de la PrP <sup>C</sup> en PrP <sup>Sc</sup> .....	63
<b>6 Porfirias.....</b>	<b>66</b>
6.1 Modelos animales de CEP .....	67
.....	<b>68</b>
.....	<b>68</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>68</b>

<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>70</b>
<b>1 Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP recombinantes de humano .....</b>	<b>71</b>
<b>2 Expresión y purificación de las PrP recombinantes humanas.....</b>	<b>73</b>
2.1 Transformación de plásmidos en bacterias <i>E. coli</i> DE3 mediante choque térmico .....	73
2.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes para su uso en resonancia magnética nuclear.....	73
2.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes para su uso en los sistemas de propagación <i>in vitro</i> .....	75
<b>3 PMCA para la propagación de priones <i>in vitro</i>.....</b>	<b>77</b>
3.1 Preparación de sustratos basados en homogeneizado de encéfalo de mamífero .....	77
3.2 Preparación de sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo .....	77
3.3 Propagación <i>in vitro</i> de priones mediante PMCA y testado de compuestos URO I y TMPyP-Fe(III)	78
<b>4 Digestión de muestras con proteinasa K.....</b>	<b>79</b>
<b>5 Detección de proteínas mediante electroforesis y <i>Western blot</i> .....</b>	<b>80</b>
<b>6 Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear de la interacción entre la URO I y la PrP recombinante humana.....</b>	<b>81</b>
<b>7 Estudios de permeabilidad de la uroporfirina I a la barrera hematoencefálica <i>in vitro</i> .....</b>	<b>81</b>
<b>8 Descripción y generación de los diferentes modelos transgénicos murinos utilizados en los estudios <i>in vivo</i> .....</b>	<b>83</b>
8.1 TgURO .....	83
8.2 Proceso de trasplante de médula ósea de ratones TgURO homocigotos en ratones de genotipo silvestre/ <i>wild-type</i> .....	86
<b>9 Estudios de infectividad <i>in vivo</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>10 Estudios estadísticos para la obtención de las curvas de supervivencia .....</b>	<b>89</b>
<b>11 Estudios neuropatológicos .....</b>	<b>89</b>
<b>12 Determinación de los niveles de uroporfirina I en diferentes tejidos por HPLC .....</b>	<b>90</b>
12.1 Procesamiento de encéfalo y sangre.....	90
12.2 Método de procesamiento por HPLC .....	90
<b>13 Procesamiento de bazos para detección de PrP<sup>Sc</sup> mediante PMCA.....</b>	<b>91</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>94</b>
<b>1 La uroporfirina I inhibe la propagación de priones <i>in vitro</i> con mayor eficiencia que el TMPyP-Fe(III).....</b>	<b>95</b>
<b>2 La uroporfirina I presenta la capacidad de inhibir la propagación de distintas cepas de priones y de priones de diferentes especies <i>in vitro</i> .....</b>	<b>96</b>
2.1 La uroporfirina I presenta la capacidad de inhibir la propagación de priones de diferentes especies <i>in vitro</i> .....	97
2.2 La uroporfirina I inhibe la propagación de diferentes cepas priónicas murinas <i>in vitro</i> a distintas concentraciones .....	99
<b>3 La uroporfirina I se une a la proteína del prion humana e inhibe la propagación de priones humanos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>100</b>
3.1 La uroporfirina I interacciona directamente con la proteína del prion humana .....	100
3.2 La uroporfirina I inhibe la propagación de priones recombinantes humanos <i>in vitro</i> .....	101

<b>4</b>	<b>Estudio preliminar de las propiedades farmacocinéticas del URO I .....</b>	<b>103</b>
4.1	La uroporfirina I se elimina rápidamente a través de la orina .....	103
4.2	Un modelo celular de barrera hematoencefálica muestra una baja permeabilidad a la uroporfirina I .....	104
<b>5</b>	<b>La uroporfirina I causa un retraso en la manifestación de los signos clínicos en modelos animales de enfermedad priónica adquirida .....</b>	<b>105</b>
5.1	Los modelos animales TgURO presentan una alta y persistente concentración de uroporfirina I en sangre .....	106
5.2	La uroporfirina I aumenta la supervivencia de los ratones infectados con diferentes cepas priónicas .....	107
5.3	Los niveles de uroporfirina I se correlacionan con el retraso en el desarrollo de signos clínicos .....	108
5.4	Los patrones de las lesiones espongiiformes y la distribución de depósitos de PrP <sup>Sc</sup> no muestran diferencias entre el modelo de enfermedad y el modelo silvestre .....	109
5.5	La uroporfirina I interfiere con la diseminación de la PrP <sup>Sc</sup> hacia el bazo .....	112
<b>6</b>	<b>La uroporfirina I causa un retraso en la manifestación de los signos clínicos en el modelo animal de enfermedad priónica espontánea .....</b>	<b>113</b>
6.1	Generación de un modelo animal de enfermedad priónica espontánea .....	113
6.2	La uroporfirina I retrasa los signos clínicos en el modelo de enfermedad espontánea .....	115
6.3	Los patrones de lesiones y depósitos de PrP <sup>Sc</sup> no muestran diferencias entre TgVUR 4x homocigotos y heterocigotos .....	116
<b>7</b>	<b>Una mínima cantidad de uroporfirina I en el encéfalo es necesaria para detener la propagación priónica.....</b>	<b>118</b>
7.1	Elección del modelo animal para la realización del trasplante de médula ósea y la infección priónica posterior .....	118
7.2	El trasplante de médula ósea da lugar a la generación y acumulación de URO I en animales de genotipo silvestre .....	119
7.3	La concentración de URO I en la sangre de los animales trasplantados fue insuficiente para retrasar la aparición de la enfermedad priónica .....	120
7.4	Los patrones de lesiones y depósitos de PrP <sup>Sc</sup> no muestran diferencias entre animales sin trasplantar y trasplantados .....	121
	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>122</b>
	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>122</b>
	<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>122</b>
	<b>LISTA DE PUBLICACIONES .....</b>	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>

RESUMEN/SUMMARY

Las enfermedades espongiformes transmisibles son una serie de trastornos neurodegenerativos cuyo desenlace es siempre fatal y que están causadas por adquisición de una conformación aberrante por la proteína priónica celular (PrP<sup>C</sup>) hacia una isoforma tóxica llamada PrP<sup>Sc</sup>. Las enfermedades priónicas afectan a un gran número de especies de mamífero, incluyendo a los humanos. En la actualidad no existe ningún tratamiento ni profiláctico ni terapéutico contra estas patologías y, además, la mayoría de los compuestos que se han descrito como posibles fármacos no han obtenido buenos resultados en ensayos clínicos. Hasta el momento, se han estudiado diversas estrategias para evitar la propagación y acumulación de la PrP<sup>Sc</sup>, que pueden clasificarse como estrategias basadas en inmunoterapia, en la disminución de la PrP<sup>C</sup>, en la eliminación de la PrP<sup>Sc</sup> y en la inhibición del malplegamiento de la proteína priónica. Dentro de las estrategias basadas en evitar el malplegamiento de la proteína priónica destacan las chaperonas farmacológicas, las cuales tienen como objetivo interactuar con la PrP<sup>C</sup> estabilizando su conformación nativa y/o evitando su interacción con la PrP<sup>Sc</sup> y con ello, su malplegamiento.

En esta tesis se describe el papel de la uroporfirina I como potencial chaperona farmacológica que inhibe con gran efectividad la propagación priónica tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta porfirina ha sido sometida a diferentes estudios de propagación priónica *in vitro* utilizando la técnica de PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*), mostrando su amplia capacidad inhibitoria en diferentes especies animales, así como en diferentes cepas de una misma especie. Por otro lado, aunque su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica y sus características farmacocinéticas resultan limitadas, se han podido llevar a cabo estudios de efectividad *in vivo* gracias a dos modelos animales llamados TgURO y TgVUR. Los modelos TgURO homocigotos (HO), que acumulan niveles elevados de uroporfirina I, han permitido realizar estudios de supervivencia utilizando diferentes cepas priónicas como inóculos. A su vez, los modelos TgVUR (HO), que además de conservar la capacidad de acumular uroporfirina I de forma natural sobreexpresan la PrP del topillo rojo (especie conocida por padecer una enfermedad priónica de forma espontánea), han posibilitado ampliar los estudios de efectividad ante una enfermedad priónica esporádica. En ambos modelos la presencia de niveles elevados de uroporfirina I resultó en un retraso significativo del desarrollo de la patología. Finalmente, dadas las dificultades para la administración de uroporfirina I de forma exógena, el modelo TgVUR (HO) también ha permitido evaluar su efectividad en ratones de genotipo silvestre mediante el trasplante de médula ósea, revelando la necesidad de explorar vías de administración alternativas.

Por todo ello, los resultados obtenidos demuestran la efectividad de la uroporfirina I como inhibidor frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles, tanto adquiridas como esporádicas. Sin embargo, también se revelan las dificultades para su administración, siendo necesarios nuevos estudios para solventar estas limitaciones y desarrollar así una terapia efectiva para las enfermedades priónicas basada en este prometedor compuesto.

Transmissible spongiform encephalopathies are a group of invariably fatal neurodegenerative diseases which are caused by a toxic isoform of the cellular prion protein (PrP<sup>C</sup>) with an aberrant conformation, called PrP<sup>Sc</sup>. Prion diseases affect numerous mammalian species, including humans. Nowadays, there is neither prophylactic nor therapeutic treatment for these pathologies. Moreover, most of the compounds that have been found effective *in vitro* or in animal models have not shown good results in different clinical trials. Until now, various strategies have been studied aiming to avoid de prion propagation and its accumulation which can be classified as: strategies based on immunotherapy, on reduction of PrP<sup>C</sup> expression, on PrP<sup>Sc</sup> degradation and on inhibition of PrP<sup>C</sup> misfolding. Among the strategies based on avoiding prion protein misfolding, pharmacological chaperones stand out which interact with the PrP<sup>C</sup> stabilizing its native conformation and/or avoiding its interaction with PrP<sup>Sc</sup> and thus the misfolding event.

Here the role of uroporphyrin I as a potential pharmacological chaperone that inhibits prion propagation *in vitro* and *in vivo* is explored. The efficacy of this porphyrin to inhibit prion propagation *in vitro* has been evaluated using PMCA (*Protein Misfolding Cyclic Amplification*), revealing its high inhibition capacity for several prion strains affecting different animal species. Although the ability to cross the blood brain barrier and pharmacokinetic properties of this compound were limited, availability of TgURO and TgVUR models, allowed performing different effectiveness studies *in vivo*. TgURO homozygous (HO) models, which produce and accumulate high levels of uroporphyrin I, have permitted to study the effect of this compound on the survival of animals inoculated with different prion strains. In addition, TgVUR (HO) models, derived from the previous transgenic line, accumulate high levels of uroporphyrin I and overexpress bank vole PrP<sup>C</sup> (this rodent species is a well-known for developing a sporadic prion disease), allowing to expand effectiveness studies with uroporphyrin I to sporadic prion diseases. In both models, the presence of high amounts of uroporphyrin I resulted in a significant delay of the disease development. Finally, given the difficulties found for uroporphyrin I administration, the TgVUR (HO) model was also used to evaluate the effectiveness of this compound in wild-type mice through bone marrow transplant. However, this administration strategy failed, not reaching the levels of uroporphyrin I required to delay disease onset and therefore revealing the need of alternative administration routes.

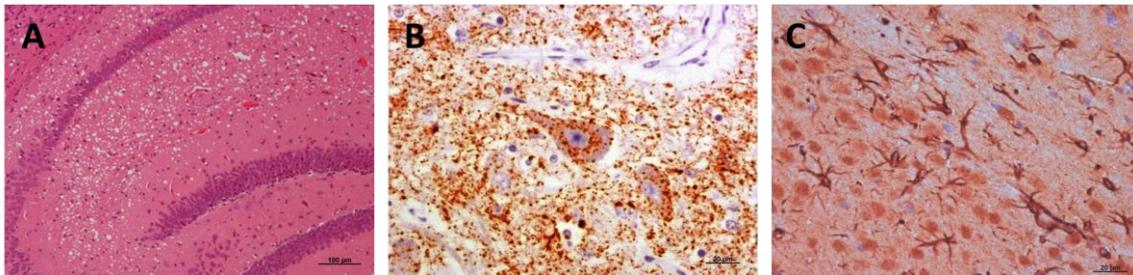
Altogether, the results presented herein demonstrate the effectiveness of the uroporphyrin I as inhibitor of prion propagation in both, acquired and sporadic transmissible spongiform encephalopathies. However, administration difficulties were also found, highlighting the need of new administration strategies that would allow to develop an effective therapy for prion diseases based on this promising compound.

# INTRODUCCIÓN

## 1 ¿Qué son las encefalopatías espongiformes transmisibles?

Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) son un conjunto de enfermedades neurodegenerativas letales que afectan a diversas especies de mamíferos, incluyendo a los humanos [1]. Entre las enfermedades que afectan a humanos, se han descrito el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD, del inglés, *Creutzfeldt-Jakob Disease*), el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el insomnio familiar letal (FFI, del inglés, *Fatal Familial Insomnia*) y la prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (VPSPr, del inglés, *Variably Protease Sensitive Prionopathy*). Por otro lado, en el resto de los mamíferos destacan el *scrapie* o tembladera en pequeños rumiantes, la enfermedad debilitante crónica (CWD, del inglés, *Chronic Wasting Disease*) presente en cérvidos, la encefalopatía espongiforme felina (FSE, del inglés, *Feline Spongiform Encephalopathy*) observada en felinos domésticos, la encefalopatía transmisible del visón (TME, del inglés, *Transmissible Mink Encephalopathy*) y la encefalopatía espongiforme bovina (BSE, del inglés, *Bovine Spongiform Encephalopathy*), también conocida como el “mal de las vacas locas”.

Las EET pueden manifestarse con diversos signos neurológicos, siendo los más comunes las disfunciones cognitivas y motoras progresivas, principalmente la ataxia cerebelosa. El período de aparición de los signos clínicos puede variar entre individuos (desde meses hasta años), pero una vez detectados los primeros síntomas, se produce una neurodegeneración de progresión rápida en la mayoría de los casos con un desenlace siempre fatal. En los estudios *post mortem* de encéfalos de personas afectadas se puede observar una neuropatología con una acusada astrogliosis, una variable degeneración espongiforme debida a la pérdida neuronal y acúmulos de agregados proteicos (figura 1)[2].



**Figura 1. Anomalías histopatológicas observables en los encéfalos de animales afectados por una enfermedad priónica.** A) Imagen del hipocampo de un ratón con scrapie donde se aprecia el daño espongiforme o vacuolización. Tinción con hematoxilina - eosina. B) Deposición de PrP resistente a proteasas en medula oblongada de una oveja con scrapie. Tinción con anticuerpo anti - PrP L42. C) Gliosis reactiva en la corteza cerebral de un ratón con scrapie. Tinción con anticuerpo anti-Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP) (Modificado de Barrio 2019).

Debido a la heterogeneidad de los signos clínicos que presentan los diferentes tipos y subtipos de EET y su similitud con las manifestaciones clínicas de otras enfermedades neurodegenerativas como el párkinson, alzhéimer, etc., el diagnóstico *ante mortem* basado exclusivamente en los signos clínicos

resulta insuficiente y es muy complicado emitir un diagnóstico definitivo y completo. Por ello, los estudios neurohistopatológicos de tejido encefálico *post mortem* resultan imprescindibles en la mayoría de los casos. Las características de las lesiones detectadas mediante histopatología, sumado a los distintos tiempos de aparición de la enfermedad y los signos clínicos permiten, además, diferenciar entre las distintas EET descritas.

Una de las características más relevantes de estas patologías es la propiedad de transmitirse entre individuos. Este hecho distintivo llevó inicialmente a los investigadores a creer que este tipo de enfermedades estaban causadas por un virus lento. Sin embargo, la ausencia de evidencias que respaldaran la existencia del virus lento como agente causal hicieron que otras teorías que relacionaban el origen de las EET con un agente infeccioso de tipo proteico fueran ganando peso [1].

### 1.1 Antecedentes históricos

Las primeras alusiones documentadas sobre las EET datan del año 1723, donde un grupo de pastores de la región de Licolnshire hace una petición al parlamento de Inglaterra. En ella se demanda una mayor regulación en las importaciones de ganado ovino debido a un brote de tembladera o *scrapie* en el área provocado probablemente por la oveja merina de origen español [3]. Posteriormente, entre los siglos XVIII y XIX, van apareciendo textos de distinta índole, tratando la problemática de la aparición de brotes de *scrapie* en rebaños en distintas localidades de todo el Reino Unido [4]. Durante este período, se elaboraron diferentes teorías que trataban de explicar las causas de la enfermedad, aludiendo a una sobreactividad sexual en los rebaños, a las tormentas, a una infección por el parásito *Sarcosporidium* [4] o a un “agente filtrable” de origen desconocido [3].

A finales de los años 30, Cuille y Chelle demostraron por primera vez de forma experimental que se trataba de una enfermedad trasmisible. Ambos realizaron inyecciones intraoculares de médula ósea proveniente de una oveja infectada por tembladera a ovejas sanas [5]. Estos experimentos fueron corroborados por W. Gordon en 1938, confirmando la naturaleza infecciosa del agente causal [3]. Durante la 2ª Guerra Mundial, los estudios sobre *scrapie* cesaron en su mayoría y solamente fueron continuados por D.R. Wilson, quien evidenció que se trataba de un agente de carácter inusual, el cual era filtrable, resistente a la desecación durante tiempos extensos y con un período largo, aunque variable de incubación [6].

Paralelamente, a principios del siglo XX, los neurólogos Hans Creutzfeldt y Adolf Jakob documentaban, de forma independiente, los primeros casos de una afección neurológica extraña, compleja y de rápido progreso, la cual no se había identificado hasta el momento [7, 8]. Posteriormente se demostró que no todos los casos descritos por Creutzfeldt y Jakob padecían una EET. Sin embargo, fue la primera enfermedad priónica que se detectó en humanos, por lo que, en 1922, el neurólogo Spielmeyer la nombró Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (CJD).

Durante los años siguientes, se fueron describiendo otros síndromes o patologías que posteriormente se incluirían dentro del grupo de las EET. Entre ellas destaca el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), que fue descrito en 1936 por los neurólogos que le dieron nombre, en varios miembros de una familia y que luego pasaría a formar parte del grupo de enfermedades priónicas humanas [9].

No sería hasta la década de los 50 del siglo XX cuando el descubrimiento del kuru provocaría un punto de inflexión en el campo de investigación de las enfermedades priónicas. En esos años, el doctor Vincent Zigas, oficial médico de la región en Papúa, Nueva Guinea, describió una dolencia similar a una encefalitis entre algunos miembros de la etnia *fore*. La casuística de esta enfermedad llamó la atención de muchos investigadores y curiosos, entre ellos el pediatra Carleton Gajdusek, quien viajó a la región a estudiar la desconocida encefalitis. Allí, junto con el doctor Zigas, analizaron los signos clínicos del kuru, así como el estilo de vida de los *fore*; observando que la sintomatología cambiaba de individuo a individuo, su progresión era variable y que la dolencia la sufrían, sobre todo, mujeres y niños. Esta última característica presentaba cierta relevancia, ya que entre los miembros de los *fore* se practicaba el canibalismo a modo de ritual funerario, siendo las mujeres y niños los que se alimentaban, principalmente, del cerebro. Por ello, los investigadores relacionaron esta tradición con la transmisión de un virus lento, el cual era la causa de la encefalitis que sufrían. Los estudios histopatológicos de encéfalos de individuos afectados por kuru realizados por Zigas y Gajdusek llamaron a su vez la atención de Igor Klatzo, que después de trabajar sobre algunos encéfalos proveniente de los *fore*, le escribió a Gajdusek revelando las similitudes de las lesiones observadas entre el kuru y la CJD [10].

Por otro lado, el patólogo veterinario William Hadlow, durante su asistencia a una exhibición, observó las fotos de las lesiones histopatológicas que sufrían los afectados por kuru y las relacionó con las observadas en ovejas que padecían scrapie. Así, se puso en contacto con el Dr. Gajdusek para dar a conocer sus observaciones y sugerirle probar la posible transmisibilidad del agente causal del kuru en primates [11]. En 1966, en un artículo publicado en la revista *Nature*, Gajdusek, Gibbs y Alpers, confirmaron que habían conseguido infectar chimpancés con kuru [12]. El éxito de este experimento, junto con las observaciones de Klatzo, llevaron a repetir de forma exitosa las inoculaciones en chimpancés, pero con material proveniente de pacientes que habían fallecido por CJD [13].

A partir de aquí y durante el siglo XX, diferentes patologías, tanto animales como humanas, fueron descubiertas e incluidas en el creciente listado de lo que se definiría después como enfermedades priónicas o EET.

### **1.2 Descubrimiento del agente causal**

A pesar de los numerosos esfuerzos por determinar el agente causal de estas enfermedades, este parecía imposible de identificar. Se sabía por diferentes experimentos realizados en animales, que era un agente filtrable, con largos períodos de incubación, transmisible y resistente a diferentes agentes químicos [5, 6]

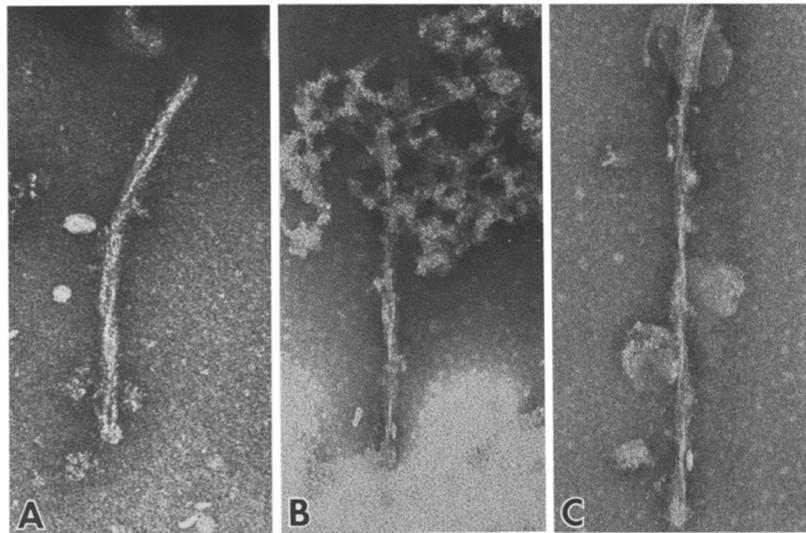
[12]. Todo ello sugería que debía de tratarse de un virus de progresión lenta, el cual infectaba el sistema nervioso central (SNC) [14].

Los experimentos realizados por Pattison y colaboradores fueron fundamentales para revelar ciertas características de este agente causal que actuaba de forma inusual. Estos investigadores demostraron la transmisibilidad entre especies al infectar cabras utilizando encéfalo de oveja enferma. Con estos experimentos, no solamente evidenciaron la transmisibilidad entre especies, sino que revelaban la presencia de dos síndromes bien diferenciados que se bautizaron como “*scratching*” y “*nervous*” atendiendo a los signos clínicos que causaban, los cuales aparecían cuando se inoculaba *scrapie* en cabras y ovejas y que achacaron a la existencia de dos cepas [15]. Este hecho constituía otra prueba más a favor de la teoría de que el agente causal de esta enfermedad era un virus lento. Estas dos cepas mostraban aspectos diferenciales entre ellas, como los tiempos de incubación y signos clínicos; siendo la primera mención a la existencia de cepas con características diferentes que se presentan en las enfermedades priónicas. Poco después, Chandler en 1961, conseguía infectar ratones utilizando encéfalo de oveja enferma con *scrapie* mostrando diferencias en la susceptibilidad de ratones con diferente fondo genético a la infección [16], apoyando la premisa de la existencia de un virus lento y sus cepas.

Sin embargo, este patógeno mostraba unas características que no coincidían con las asociadas habitualmente a los virus. Previamente, Wilson y Pattison demostraron la resistencia de este patógeno a las altas temperaturas, formalina, fenol y cloroformo [17]. De hecho, muchos investigadores evitaban mencionar la palabra virus en los artículos relacionados con estas patologías y utilizaban la palabra agente. Estos creían que sus características físico - químicas no se relacionaban con la presencia de un ácido nucleico [17]. Entre ellos destacaron Tikvah Alper y colaboradores, que evidenciaron que el agente causante de las EET poseía una alta resistencia a la radiación ultravioleta en comparación con los virus conocidos hasta el momento, sugiriendo la ausencia de ácidos nucleicos [18, 19]. Por lo tanto, proponían que el agente que causa el *scrapie* es capaz de replicarse en el huésped que infecta, pero sin la presencia de ningún ácido nucleico. En consecuencia, el método de propagación utilizado por este patógeno continuaba siendo desconocido. En este sentido, fue Griffith el primero en hipotetizar una posible alternativa a la replicación en ausencia de ácidos nucleicos. Según sus modelos matemáticos, una entidad proteica con capacidad autorreplicativa sería capaz de propagarse exitosamente en el huésped que infecta y causar una patología [20].

### 1.3 Hipótesis de “solo proteína”

La década de los 80 trajo consigo un cambio en el dogma central de la biología postulada por Watson y Crick, gracias a Stanley Prusiner, quien fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1997 por su investigación en el campo de los priones. Apoyándose en los estudios de Griffith con su modelo de proteína con capacidad autorreplicativa y en todas las evidencias anteriores que demostraban la existencia de un agente resistente a la acción de nucleasas, así como a agentes físico-químicos capaces de destruir los ácidos nucleicos pero a su vez, sensible a proteasas y agentes alcalinos, Prusiner propuso que el agente causante de las diferentes encefalopatías espongiformes era una partícula proteica de pequeño tamaño para el que acuñó el término prion (del inglés, *proteinacious infectious particle*) [21].



**Figura 2. Imágenes de microscopía electrónica de fibras denominadas SAF (scrapie associated fibrils) asociadas a enfermedad priónica.** A y C) Fibras obtenidas de un encéfalo de ratón inoculado con la cepa de scrapie adaptada a ratón 139A. B) Fibras obtenidas de un encéfalo de ratón inoculado con la cepa de scrapie adaptada a ratón 87V. Todas las muestras se tiñeron con PTA (ácido fosfotúngstico), aumento de X 180 000 (Modificado de Mertz 1981).

Bolton y colaboradores consiguieron ese mismo año aislar del encéfalo de un hámster infectado con *scrapie* una proteína de entre 27 y 30 kDa, resistente a la digestión por proteinasa K (PK) y que no aparecía en muestras de encéfalo de hámster sano [22]. Previamente, Merz y colaboradores consiguieron las primeras fotografías de lo que ellos denominaron como SAF (del inglés, *scrapie-associated fibrils*), que eran fibras (del inglés, *rods*) de tipo amiloide que solamente aparecían en el encéfalo de ratones infectados con diferentes cepas de *scrapie* (figura 2) [23].

Sucesivos experimentos demostraron que las fibras contenían mayoritariamente una proteína, con las características previamente mencionadas, a la que llamaron Proteína del Prion (PrP, del inglés, *Prion Protein*), y en particular el fragmento de 27-30 kDa de dicha proteína, al cual llamaron PrP<sup>27-30</sup> [24]. Así, se postuló que las placas amiloides presentes en las EET estaban formadas por PrP [25]. Poco después, el grupo liderado por S. Prusiner consiguió aislar y obtener la secuencia aminoacídica del amino terminal de la PrP, lo que permitió concluir que la proteína de 27-30 kDa presente en los encéfalos de animales infectados provenía de la digestión proteolítica parcial de una proteína mayor de entre 33 y 35 kDa.

Además, esta proteína de 33-35 kDa se encontró también en animales sanos y, a diferencia de la PrP<sup>27-30</sup>, era sensible a la digestión por PK [26, 27].

Finalmente, a partir de todas estas evidencias, el equipo de C. Weissman reportó que la proteína priónica se codificaba en un gen de copia única y que las diferentes isoformas que existían se debían a posibles modificaciones post traduccionales o a múltiples variaciones conformacionales. Así, las dos formas conocidas fueron descritas como PrP 33-35<sup>C</sup> (de celular), la cual se encuentra de manera ubicua en el SNC de animales y PrP 33-35<sup>Sc</sup> (de *scrapie*) la versión infecciosa, presente en animales infectados y que daba lugar a la PrP<sup>27-30</sup> al ser digerida parcialmente con PK [28].

Todos estos descubrimientos acerca de la proteína que formaba los agregados que se observaban en individuos afectados, avalaban la hipótesis planteada por S. Prusiner de “solo proteína”. Esta teoría manifiesta que la PrP<sup>Sc</sup>, una conformación aberrante de la proteína del prion celular es el agente causal de las EET y, por tanto, la única responsable de la enfermedad priónica, siendo su replicación independiente de la presencia de ácidos nucleicos.

### 1.4 Fundamentos moleculares de la hipótesis de “solo proteína”

A pesar de todos los estudios llevados a cabo, la teoría de que un agente infeccioso de origen proteico fuera capaz de replicarse en un huésped y causar una enfermedad sin la necesidad de un ácido nucleico, todavía se trataba con cierta cautela. Por ello, a pesar de los descubrimientos hechos por Alper, Griffith y Prusiner, entre otros, resultaban indispensables más estudios que respaldaran esta hipótesis. Se sabía que esta proteína llamada prion, estaba codificada en un gen de copia única llamado *PRNP*, la cual resultaba en una proteína ubicua y benigna (PrP<sup>C</sup>) que por un proceso desconocido se transformaba en PrP<sup>Sc</sup>, capaz de iniciar un proceso infeccioso [28]. Estudios concluyeron que el precursor de la PrP<sup>Sc</sup> era indistinguible de la isoforma PrP<sup>C</sup>; por tanto, se teorizó sobre la probabilidad que fueran modificaciones post traduccionales aberrantes que sufría la PrP<sup>C</sup> durante su metabolismo [29], pero no se pudo demostrar, sugiriendo que solamente se diferenciaban entre ellas por su conformación [30].

Explicar la diferencia entre las dos conformaciones podría ser la clave para desentrañar las diferencias en el comportamiento de ambas isoformas. Esta información se obtuvo mediante los datos extraídos de la técnica de espectroscopía infrarroja con transformación de Fourier (FTIR, del inglés *Fourier-transform infrared spectroscopy*) y de la técnica de dicroísmo circular (CD, del inglés *circular dichroism*), gracias a estos resultados se confirmó la existencia de un cambio conformacional que sufría la PrP<sup>C</sup> basado en una disminución de alfa hélice a favor de un aumento en la PrP<sup>Sc</sup> de lámina beta en sus respectivas estructuras secundarias [31, 32].

Este cambio conformacional explica las características bioquímicas que diferencian a cada isoforma de la proteína como su insolubilidad en detergentes no iónicos [33] o su resistencia parcial a la digestión por PK [34]. Esta última particularidad relaciona la coexistencia de las dos isoformas conocidas de la PrP dado que la digestión con PK transforma la PrP<sup>33-35</sup> eliminando sus primeros 90 aminoácidos y dando lugar a un

núcleo resistente de 27-30 kDa (PrP<sup>27-30</sup>) distinguible por su patrón de movilidad en un gel de electroforesis. De igual forma, el aumento de láminas beta resulta en una tendencia a la agregación y formación de fibras amiloides, las cuales se acumulan en forma de placas en el SNC [35]. Actualmente, la presencia de PrP<sup>27-30</sup> resistente al tratamiento por PK, así como su identificación mediante el uso de anticuerpos sigue siendo un marcador patognomónico válido de las EET. Sin embargo, el reciente descubrimiento de la VPSP<sup>r</sup> muestra discordancia con esta última afirmación, ya que en esta enfermedad priónica la PrP<sup>Sc</sup> causante muestra cierta sensibilidad a la digestión por PK [36].

La relación entre las formas familiares de EET y las mutaciones presentes en el gen *PRNP* fue otra evidencia que apoyaba la teoría de “solo proteína”. En 1989 Hsiao y colaboradores relacionaron la mutación P102L de la PrP con el GSS, describiendo así la primera mutación ligada a una EET [37]. En la actualidad, se han descrito más de 60 mutaciones relacionadas con el gen de la PrP humana, las cuales suponen aproximadamente el 15 % del total de las enfermedades priónicas diagnosticadas [38].

### 1.5 Modelos *in vivo* que avalan la hipótesis de “solo proteína”

Los primeros modelos animales que se utilizaron para estudiar las enfermedades priónicas fueron aquellos en los que se había observado la enfermedad en la naturaleza, o animales taxonómicamente más cercanos a los mismos. Durante la década de los sesenta y setenta, los modelos más utilizados fueron las ovejas, las cabras y los chimpancés. No obstante, estos animales presentaban ciertos inconvenientes a la hora de experimentar con ellos, como su gran tamaño o los períodos largos de incubación. Por ello, surgió la necesidad de modelos experimentales que pudieran replicar estas patologías, pero de una forma más adecuada para el trabajo en el laboratorio. Los primeros avances fueron dirigidos por Chandler cuando inoculó homogeneizado de cerebro perteneciente a una oveja afectada por *scrapie* a tres cepas diferentes de ratones [16]. El hecho de poder investigar las EET en modelos murinos ayudaría a avanzar de forma significativa en los estudios acerca de estas patologías. En consecuencia, en los siguientes años, diferentes enfermedades priónicas como la BSE [39] o la CJD [40] se irían adaptando a ratones de genotipo silvestre mediante inoculaciones sucesivas.

En las siguientes décadas, se fueron desarrollando diversos ratones transgénicos que ayudarían a profundizar en el comportamiento de las diferentes cepas priónicas, así como en otros aspectos bioquímicos. El primer transgénico fue un ratón que expresaba la PrP de hámster sirio, el cual mostraba todas las características específicas que aparecían en el hámster sirio ante una infección por priones, como los períodos de incubación observados al infectar este con una cepa de *scrapie* [41]. Este suceso permitiría experimentar con PrP de especies con las que *a priori* no se podía trabajar, hecho fundamental para la comprensión del comportamiento del agente causal en distintas especies, además de demostrar que el curso de la enfermedad dependía casi exclusivamente de la PrP expresada.

Una de las pruebas más relevantes que respaldó la hipótesis de “solo proteína” se basó en la generación de un ratón transgénico al cual se le había eliminado el gen *PRNP*. Estos animales carentes de PrP<sup>C</sup>,

demonstraron ser resistentes a la infección por scrapie, ya que no presentaron ninguna de las características que se observan en la infección por priones, como la acumulación de PrP<sup>Sc</sup>, signos neurológicos y/o propagación de PrP<sup>Sc</sup> [42]. Esto confirmaba la hipótesis de “solo proteína”, ya que la presencia de PrP<sup>C</sup> era indispensable para que se produjera la infección por PrP<sup>Sc</sup>. Además, reveló que el desarrollo de la infección es dependiente de los niveles de PrP<sup>C</sup> presentes en el SNC, y estos a su vez, son inversamente proporcionales a los tiempos de incubación y progresión de la enfermedad [42]. La misma idea quedó respaldada en un experimento donde los ratones transgénicos que sobreexpresaban PrP<sup>C</sup> mostraban tiempos de incubación reducidos respecto a ratones con niveles basales de PrP<sup>C</sup> [43]. Sin embargo, se observó también que la acumulación de PrP<sup>Sc</sup> no era directamente proporcional a la neurodegeneración [44], disociándose por primera vez la neurotoxicidad de la presencia de placas de PrP<sup>Sc</sup>.

Por otra parte, otro aspecto que respaldaba la teoría de “solo proteína” se basaba en la premisa de que determinados cambios específicos en el gen *PRNP*, asociados a las EET genéticas descritas en humanos, debían producir de forma espontánea la enfermedad en modelos animales. La inserción de la mutación equivalente al P102L, que está ligada al desarrollo de GSS, en la PrP de ratón y la aparición de signos neurodegenerativos similares a la misma patología en humanos, respaldarían también la hipótesis [45]. Posteriormente, se desarrollaron muchos otros modelos de ratones transgénicos relacionados con EET genéticas o con otras especies de especial interés. Entre ellos, cabe mencionar un modelo de ratón transgénico que expresa la PrP<sup>C</sup> bovina con una mutación asociada al GSS humano [46], modelos de ratones *knock in* que expresan mutaciones asociadas con la CJD y el FFI [47, 48] y el modelo de ratón transgénico capaz de expresar la mutación del topillo rojo (109I), la cual le hace más susceptible a sufrir un malplegamiento espontáneo y por consiguiente una EET espontánea [49].

### **1.6 Modelos *in vitro* que avalan la hipótesis de “solo proteína”**

El desarrollo de modelos *in vitro* de propagación priónica supuso para muchos la demostración definitiva de la hipótesis de “solo proteína”, además de un avance significativo en el estudio de las enfermedades priónicas, que hasta ahora se había llevado a cabo en modelos animales. El primer sistema *in vitro* que surgió fue desarrollado por B. Caughey y su grupo y se denominó ensayo de conversión libre de células. La técnica permitía utilizar PrP<sup>Sc</sup> purificada proveniente de encéfalo de animales afectados por una EET a modo de semilla y era capaz de convertir la PrP<sup>C</sup> purificada de los encéfalos de animales sanos, en PrP resistente a la digestión por PK o PrP<sup>res</sup> (diferenciada de la PrP<sup>Sc</sup> por presentar ciertas características comunes como el malplegamiento, la tendencia a la agregación y la resistencia a proteasas, pero que no recapitula completamente otras como la capacidad infectiva en modelos animales, perfil de lesiones histopatológicas o tiempos de incubación). De este modo quedaba demostrado que el malplegamiento de la PrP<sup>C</sup> estaba catalizado por la PrP<sup>Sc</sup> [50]. Sin embargo, la eficiencia de la metodología era baja, obteniéndose niveles muy bajos de PrP<sup>res</sup> resultante y sin reproducir completamente las características de la PrP<sup>Sc</sup> utilizada como semilla, siendo esto criticado por los detractores de la hipótesis “solo proteína”.

## INTRODUCCIÓN

En 2001 se realizó un gran avance en el área de los modelos *in vitro* de las enfermedades priónicas, ya que, incorporando la sonicación al proceso, pudieron obtenerse altos niveles de PrP<sup>Sc</sup> a partir de cantidades insignificantes de semilla [51]. Este ensayo fue el inicio de la técnica llamada amplificación cíclica de proteínas malplegadas o PMCA (del inglés, *Protein Misfolding Cyclic Amplification*). Esta técnica permite mediante ciclos de incubación y sonicación, aumentar de forma exponencial los niveles de PrP<sup>Sc</sup> transformando la PrP<sup>C</sup> del medio que se encuentra en los homogenizados de encéfalos de animales sanos. Esto permite la utilización de cantidades ínfimas de PrP<sup>Sc</sup> como semilla (obtenida de homogenizados de encéfalos de animales infectados), mimetizando así el proceso de propagación que se da en el SNC de los individuos afectados, pero con una cinética acelerada [52]. Además, el producto resultante de la PMCA presentaba las mismas características bioquímicas y biológicas que la PrP<sup>Sc</sup> obtenida del encéfalo de animales infectados [53]. A pesar de que el desarrollo de esta técnica supuso para muchos una demostración de la hipótesis de “solo proteína”, el hecho de que tanto la PrP<sup>C</sup> como la PrP<sup>Sc</sup> utilizada como semilla provinieran de encéfalo no excluía la presencia de otros factores como ácidos nucleicos en los homogenizados de los encéfalos utilizados.

La eliminación de factores provenientes de encéfalo en los sistemas de propagación de priones *in vitro* vino de la mano de Legname y colaboradores que demostraron que era posible malplegar la PrP recombinante (recPrP) de ratón *in vitro*, obteniéndose fibras amiloides en ausencia de PrP<sup>Sc</sup>. Estas fibras obtenidas *de novo* y en ausencia de componentes encefálicos, sin embargo, no causaban enfermedad en animales de genotipo silvestre, siendo necesaria su inoculación en modelos de sobreexpresión de PrP<sup>C</sup> murina para observarse una patología similar a las EET [54]. El hecho de que estos modelos de sobreexpresión desarrollasen espontáneamente una enfermedad similar en edades avanzadas, fue utilizado por los detractores de la hipótesis “solo proteína” para defender que las fibras generadas *in vitro* únicamente aceleraban una condición preexistente y que, por tanto, no se habían generado priones *in vitro* en ausencia de componentes encefálicos.

El siguiente paso hacia la generación de priones *in vitro* lo efectuaron Makarava y colaboradores, mediante la utilización de un método de fibrilación diferente al anterior, con el que obtuvieron priones recombinantes de hámster en *E. coli* que infectaban hámsteres de genotipo silvestre. Pero estos priones tuvieron períodos de incubación largos y requerían de un segundo pase para dar lugar a signos clínicos observables [55]. Paralelamente, Kim y colaboradores, generaron a través de PMCA priones infectivos provenientes de proteína recombinante de hámster, pero la infectividad fue baja y la semilla de PrP<sup>Sc</sup> utilizada para iniciar la propagación provenía de encéfalo de hámster infectado [56]. En ambos casos, los críticos con la hipótesis de “solo proteína” todavía no veían indicios suficientes para apoyar dicha hipótesis.

Para muchos, la demostración definitiva de esta hipótesis vendría de la mano del investigador Jiyun Ma y su grupo, cuando a partir de PrP recombinante de ratón, complementada con ARN y lípidos como cofactores, obtuvieron PrP<sup>Sc</sup> capaz de infectar a un ratón de genotipo salvaje. La ausencia de componentes

provenientes de encéfalo, así como la alta capacidad infecciosa en ratones de genotipo silvestre, en los cuales producía la patología típica de las enfermedades priónicas; confirmaban que las enfermedades priónicas están causadas por un cambio conformacional en la PrP [57] y, por tanto, significaba la evidencia definitiva de la naturaleza exclusivamente proteica del agente causal de las EET.

### 1.7 La hipótesis de “solo proteína” en la actualidad

En la actualidad, la controversia sobre la naturaleza del agente causal de las enfermedades priónicas prácticamente ha desaparecido, a excepción de un reducido número de investigadores escépticos que siguen tratando de demostrar la presencia de ácidos nucleicos asociados a estas enfermedades [58]. Las diferentes características bioquímicas, neuropatológicas, la variación en los tiempos de incubación, etc., que presentan las distintas cepas priónicas es una de las principales críticas a la hipótesis de “solo proteína”. Normalmente, la existencia de diferentes cepas se debe a cambios o mutaciones en los ácidos nucleicos de los agentes infecciosos, ya que estos les otorgan diferentes particularidades fenotípicas. Por lo tanto, la ausencia de ácidos nucleicos no podría *a priori* permitir la existencia de cepas entre los priones. Sin embargo, esta hipótesis se sostiene debido a que las singularidades de cada cepa están atribuidas a los cambios conformacionales que sufre la PrP<sup>Sc</sup> en el proceso de agregación y propagación [59]. Estas diferencias estructurales se han puesto de manifiesto a través de diferentes experimentos como los realizados mediante la técnica de PMCA, la cual es capaz de reproducir las características de cepa [53]. También se han utilizado polímeros luminiscentes conjugados que son capaces de interactuar de diferente manera dependiendo de la conformación de los agregados proteicos [60] o diferenciadas por su tamaño [61]. Así como la unión específica a anticuerpos debida a la exposición de diferentes epítopos [62]. También, el desarrollo de nuevas técnicas de propagación priónica *in vitro* más sofisticadas y eficientes sostiene esta hipótesis. A destacar aquellas capaces de propagar priones infecciosos sin el uso de componentes encefálicos y que permiten la generación de distintas cepas priónicas, prácticamente indistinguibles de los aislados de encéfalos infectados [63-65].

Por último, la presencia de agregados proteicos patológicos que surgen como resultado de un cambio conformacional sufrido por una proteína endógena en humanos, no es exclusivo de las EET humanas. La investigación en enfermedades neurodegenerativas ha puesto de manifiesto que ciertas proteínas como el péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) y tau en la enfermedad de Alzheimer, la  $\alpha$ -sinucleína en el párkinson; o distintas proteínas causantes de amiloidosis sistémicas como la  $\alpha$ -amiloidosis, tienen mecanismos de propagación similares a los priones, denominándose proteínas *prion-like*. Este término se utiliza para denominar a aquellas formas malplegadas capaces de inducir su conformación a las proteínas nativas y, con ello, provocan una patología. Apoyando así la hipótesis de “solo proteína” y la existencia de agentes patógenos exclusivamente proteicos [65].

En definitiva, la naturaleza exclusivamente proteica del agente causal de las EET es hoy en día ampliamente aceptada por la comunidad científica. No obstante, todavía quedan muchas incógnitas para la comprensión de los mecanismos moleculares que rigen estos inusuales patógenos como la estructura

que presenta la PrP<sup>Sc</sup>, el mecanismo de conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>, la posible existencia de otros cofactores implicados en el proceso de conversión, cómo se determinan las características de cepa, o cómo se desencadena la neurotoxicidad entre otros.

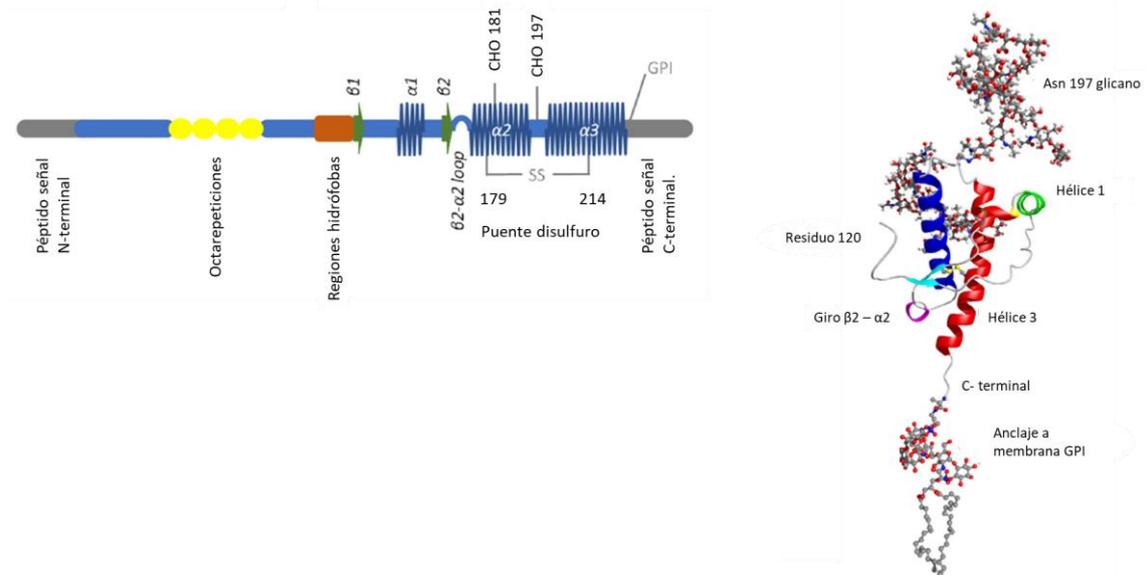
## 2 Bioquímica del agente causal

La proteína priónica está codificada en un gen de copia única denominado *PRNP* [28] y cuyo marco de lectura abierta (ORF, del inglés *open reading frame*) está contenido en un solo exón tanto en los mamíferos como en las aves en las que se ha estudiado [66]. El gen se encuentra en el brazo corto del cromosoma 20 en humanos [67] y su estructura está altamente conservada entre mamíferos, encontrándose en los cromosomas homólogos 2, 3, 13 y 13 en ratón, rata, oveja y vaca, respectivamente. Aun así, el gen *PRNP* humano presenta 2 exones, siendo el último el que contiene la ORF, a diferencia de la *PRNP* murina que está compuesta de 3 exones, estando la ORF en el último, igual que en otras especies como la rata, la oveja y la vaca [68]. También se han identificado genes homólogos al gen *PRNP* en otras especies no mamíferas como aves [69], peces [70], reptiles [71] y anfibios [72], aunque por el momento no se han descrito enfermedades priónicas en ninguna de ellas, posiblemente debido a que presentan una similitud de secuencia de alrededor de un 30 % respecto a las de mamífero [73].

### 2.1 PrP<sup>C</sup>

La PrP<sup>C</sup> se expresa inicialmente como una proteína que consta de 250 aminoácidos (con pequeñas variaciones entre especies) y presenta péptidos señal tanto en el extremo N-terminal, el cual dirige la proteína a la membrana celular, como en el extremo C-terminal, que codifica un anclaje glicosilfosfatidilinositol (GPI, del inglés *glycosylphosphatidylinositol*). La eliminación de ambos péptidos señal resulta en una proteína de unos 208 aminoácidos con pequeñas variaciones entre especies, cuyos residuos comprenden desde el 23-230 de la proteína inmadura (figura 3) [74]. La PrP<sup>C</sup> se encuentra anclada en la membrana mediante un GPI, mayoritariamente en balsas lipídicas, donde sufre una rápida endocitosis constitutiva para su posterior reciclado o degradación [75]. La PrP<sup>C</sup> madura consta de un dominio amino terminal, concretamente del aminoácido 23 al 123, estructuralmente flexible [76] y que contiene una región de octarepeticiones (OR, del inglés *octapeptide repeats*), nombrada así por la presencia de cuatro o cinco repeticiones de la secuencia PHGGGWGQ [77]. Estas repeticiones varían en función de la especie, pero están altamente conservadas entre mamíferos [78]. Cambios en esta región han sido relacionados con algunas EET genéticas [79] [80]. Esta zona tiene un alto interés científico, no solo por su alta conservación o su relación con ciertas patologías, sino porque se cree que podría tener implicaciones en la función fisiológica de la PrP<sup>C</sup> a través de su capacidad de coordinar diferentes cationes bivalentes, en especial el cobre (Cu<sup>2+</sup>) [81] o por su capacidad de interacción con polianiones como la heparina / heparan sulfato [77]. Flanqueando la zona de los OR se encuentran dos zonas cargadas positivamente conocidas como CC1 y CC2 (del inglés, *charged cluster*), estas zonas están conectadas al dominio globular por una región hidrofóbica, que va del aminoácido 111 al 134, llamada HC (del inglés, *hydrofobic core*) [66].

El dominio globular carboxilo terminal está altamente estructurado y presenta una secuencia aminoacídica y una conformación muy conservada entre mamíferos de diferentes especies. De hecho, a pesar de la baja similitud entre las secuencias aminoacídicas de la PrP<sup>C</sup> de mamíferos con la de pollo, tortuga o rana (aproximadamente de un 30 %), su estructura presenta un alto grado de conservación [73]. El dominio se estructura con 2 láminas- $\beta$  antiparalelas, separadas por una región de hélice- $\alpha$  y seguidas de dos regiones de hélice- $\alpha$  [73, 82]. También se encuentra un puente disulfuro entre las dos últimas



**Figura 3. Representación esquemática de la PrP<sup>C</sup> y estructura tridimensional de la PrP<sup>C</sup> resuelta por cristalografía de rayos X.** A) Representación esquemática de los diferentes dominios de la PrP<sup>C</sup>. Los números hacen referencia a la posición del aminoácido en la PrP<sup>C</sup> humana. En la región N-terminal se encuentra el péptido señal que dirige a la PrP<sup>C</sup> hacia la membrana plasmática (residuos 1-22). A continuación, le sigue la región de las octarepeticiones y la zona rica en aminoácidos con carácter hidrofóbico. En el dominio globular aparecen dos regiones estructuradas en forma de lámina- $\beta$  y tres regiones estructuradas en forma de  $\alpha$ -hélice. Dentro de la zona globular también aparecen esquematizados el puente disulfuro entre las posiciones 179 y 214, las asparaginas (N) implicadas en la glicosilación en las posiciones 181 y 197 y el anclaje a GPI en el aminoácido 231. Por último, se encuentra una región de unos 19 aminoácidos que determina la adición del GPI, pero que es eliminada durante la maduración de la proteína.  $\beta 1$  y  $\beta 2$ : Regiones estructuradas en lámina- $\beta$ .  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ : Regiones estructuradas en  $\alpha$ -hélice. CHO: Grupo carboxilo de las asparaginas 181 y 197 a los cuales se unen los glicanos. GPI: Anclaje de Glicofosfatidilinositol a la membrana plasmática. B) Estructura tridimensional de la PrP<sup>C</sup> ovina obtenida mediante difracción de rayos X (*Protein Data Bank code 1UW3*). Se ha eliminado la región N terminal no estructurada y flexible que va desde el residuo 23 hasta el 120. (Modificado de Gill 2018).

hélices, más concretamente en las cisteínas 179 y 214 y dos asparaginas, en las posiciones 181 y 197, que pueden ser glicosiladas de forma variable, pudiendo existir PrP<sup>C</sup> no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada. Estas glicosilaciones pueden tener ácidos siálicos en cantidades elevadas unidos, y se ha observado que poseen cierto papel en el proceso de infección [83]. Sin embargo, todavía no se ha demostrado la implicación de los glicanos, así como de su proporción relativa, en las funciones biológicas de la PrP<sup>C</sup> o su conversión, aunque hay estudios que sugieren que puedan tener cierto papel en el proceso de infección y/o propagación y en la selección de cepas [84, 85].

La última característica destacable de la PrP<sup>C</sup> madura es su anclaje mediante un grupo GPI a la membrana celular. Este tipo de anclaje es bastante común entre eucariotas, encontrándose entre un 10-20 % del total de las proteínas de membrana. La unión proteína-GPI se trata de un proceso biosintético complejo

que tiene lugar en el retículo endoplasmático (RE), donde se elimina el péptido señal para añadir un GPI preformado. Todos los anclajes GPI tienen una estructura común compuesta por una etanolamina fosfato unida por un enlace amida al grupo carboxilo terminal, un núcleo altamente conservado formado por tres residuos de manosa, una glucosamina, un grupo fosfatidilinositol y colas fosfolipídicas que anclan el GPI a la membrana plasmática. La adición de glicanos en las ramificaciones y modificaciones en la fracción lipídica durante el transporte hacia la membrana, dependen del tipo celular y del organismo en el cual ocurren, dando lugar a una amplia diversidad estructural [86]. La función más importante de los anclajes de tipo GPI es ejercer una asociación estable con la bicapa lipídica [87], aunque en el caso de la función biológica de la PrP<sup>C</sup>, se desconoce si este ejerce un papel imprescindible. Sin embargo, sí que se le atribuye un papel clave en el proceso de infección, así como en el desarrollo de la patología priónica. Se ha demostrado que cambios en la composición de las balsas lipídicas que alteren su comportamiento, mutaciones en el GPI que impiden su correcta formación o no permiten su anclaje a membrana, así como modificaciones en la localización del anclaje, provocan una reducción o inhibición en la formación de PrP<sup>Sc</sup> [88-90]. Se ha observado en ratones transgénicos cuya PrP<sup>C</sup> no contiene GPI, que cuando se infectan con priones presentan grandes cantidades de proteína malplegada y placas amiloides densas, pero no muestran la característica espongirosis típica de las EET, así como signos marcados de neurodegeneración, lo que se relaciona con una neurotoxicidad más baja de la proteína sin GPI [91]. Este experimento parece indicar que la ausencia del anclaje GPI está más relacionado con el proceso de neurotoxicidad que con el de propagación. Con relación al papel del GPI; se ha especulado que, en los procesos infecciosos de las EET, se dan lugar dos fenómenos: el primero, es la conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> o propagación priónica, el segundo, es la neurotoxicidad, que como se ha mencionado anteriormente parece íntimamente relacionado con la presencia del GPI y su capacidad de iniciar cascadas de señalización intracelulares.

A pesar de los estudios realizados sobre la PrP<sup>C</sup> y el amplio conocimiento que se posee sobre su bioquímica, todavía se desconoce cuál es su función fisiológica en la célula. Se sospecha que debe tener una función sino esencial, importante debido a su ubicuidad y alta conservación entre animales de diferentes especies. No obstante, la generación de ratones transgénicos *knock out* para el gen *PRNP* (*PRNP*<sup>-/-</sup>) demostró que no padecían cambios significativos respecto a los de genotipo silvestre, salvo la resistencia a la infección por priones [42]. Este mismo hecho también se observó en vacas *PRNP*<sup>-/-</sup>, las cuales no presentaron ningún cambio neurológico ni fisiológico significativo hasta los 20 meses de edad, siendo útiles para la obtención de productos derivados (leche, suero, etc.) libres de proteína priónica [92]. Así como la ausencia de PrP<sup>C</sup> en cabras en una población caprina concreta en Noruega debido a que estas poseen mutación en el gen *PRNP* de forma natural [93]. Estudios realizados con modelos similares sin PrP<sup>C</sup> demostraron, además, que su ausencia evita que se desencadenen los procesos neurotóxicos y neurodegenerativos causados por priones [94]. El papel de la PrP<sup>C</sup> en la neurotoxicidad también viene respaldado por un estudio que demuestra que un injerto que expresa PrP<sup>C</sup> de forma normal, cuando es implantado en modelos murinos *PRNP*<sup>-/-</sup> es el único tejido que se ve afectado por la infección por priones a pesar de encontrar la PrP<sup>Sc</sup> diseminada por todo el encéfalo [95]. El papel de la PrP<sup>C</sup> como mediador de

la neurotoxicidad no es exclusivo de las EET, ya que, *in vitro*, se ha observado que la PrP<sup>C</sup> interactúa con agregados oligoméricos formados por  $\alpha$ -sinucleína, tau o proteína  $\beta$  amiloide, induciendo toxicidad, la cual desaparece cuando la PrP<sup>C</sup> no está presente, indicando un posible papel común de esta proteína en las diferentes proteinopatías neurodegenerativas [96]. La relación entre la neurotoxicidad y la PrP<sup>C</sup> está clara, pero no es probable que esta sea su única función biológica debido al alto grado de conservación entre especies animales. De hecho, se sospecha que esta toxicidad no es una propiedad intrínseca de la PrP<sup>C</sup>, sino un efecto derivado de su proceso de conversión a PrP<sup>Sc</sup> [97]. Por lo tanto, conocer la función fisiológica de la PrP<sup>C</sup> podría ayudar a entender mejor los mecanismos de toxicidad celulares, tanto de las EET, como de otras enfermedades neurodegenerativas.

Continuando con el papel biológico de la PrP<sup>C</sup>, nos encontramos con un amplio abanico de experimentos que tratan de dilucidar la función de esta proteína. Los primeros estudios se iniciaron con modelos carentes de PrP<sup>C</sup> y con la identificación de moléculas que interactuaban con ella, con el tiempo, estos estudios han ido evolucionando y mejorando con la ayuda de nuevos ensayos, tanto *in vitro* como *in vivo*, permitiendo ampliar el conocimiento que se tiene sobre la PrP<sup>C</sup>. Entre las diferentes funciones que se le han atribuido están; plasticidad y transmisión sináptica [98], formación de la memoria [99, 100], estabilización del sueño y ritmos circadianos [101], excitabilidad neuronal [102], homeostasis del calcio [103], neuroprotección [104], metabolismo del zinc, cobre y hierro [105, 106] y mantenimiento de la mielina periférica [107]. Sin embargo, muchas de estas funciones deben de ser validadas, ya que los resultados no son concluyentes o son contradictorios dependiendo del modelo usado (tratado en profundidad en [108]). Del mismo modo, los mecanismos moleculares que controlan estas funciones se desconocen, lo que dificulta esclarecer el papel biológico de la PrP<sup>C</sup> [109]. Una de las funciones de las que se tienen evidencias científicas más sólidas, es su papel en el mantenimiento de la mielina periférica presente en las neuronas, ya que la ausencia de PrP<sup>C</sup> en ratones transgénicos de avanzada edad, muestra una polineuropatía desmielinizante crónica, y, además, este fenotipo se ha observado en todas las líneas de ratones *PRNP*<sup>-/-</sup>, indicando la presencia de un fenotipo robusto [107, 110, 111].

### 2.2 Mecanismo de malplegamiento a PrP<sup>Sc</sup>

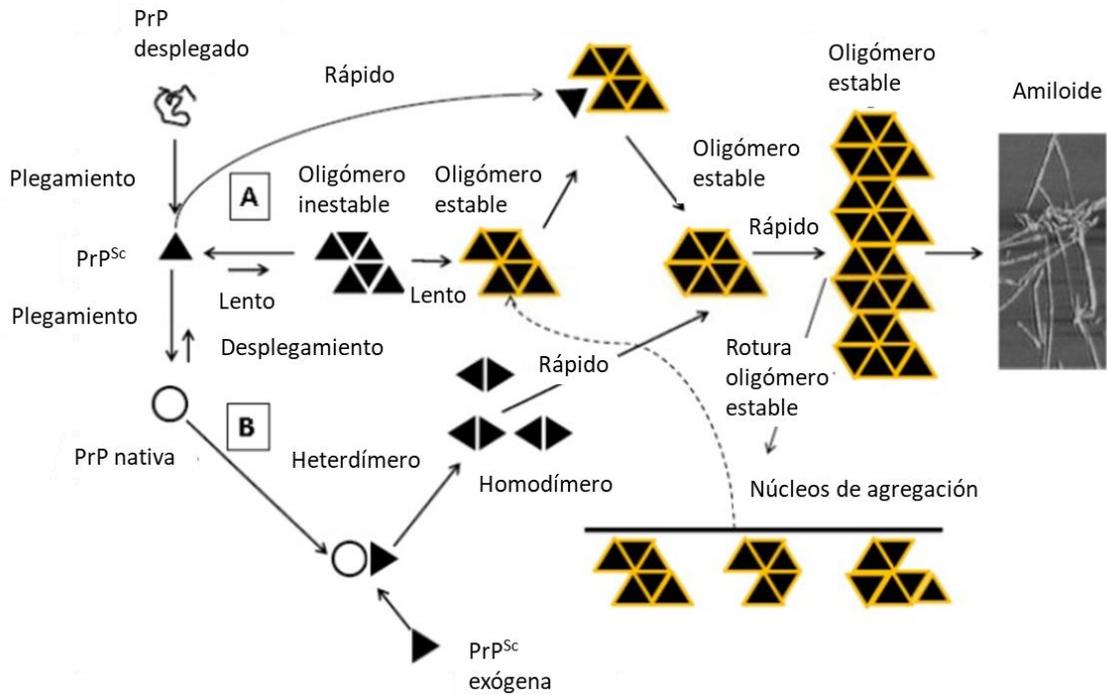
Mientras que la información que se tiene de la PrP<sup>C</sup> es extensa y se va ampliando a través de los diferentes estudios, el mecanismo molecular de conversión a PrP<sup>Sc</sup> se desconoce completamente. De acuerdo con lo que plantea la hipótesis de “solo proteína”, el proceso de malplegamiento ocurre de manera autocatalítica. Este proceso de conversión da como resultado una acumulación de fibras amiloides compuestas principalmente por PrP<sup>Sc</sup> en el encéfalo de los individuos afectados. Una diferencia significativa entre las dos isoformas de la PrP es su estructura secundaria, es decir, la proporción de  $\alpha$ -hélices y láminas- $\beta$  que presenta cada conformación. Esta particularidad hace que ambas isoformas presenten características biológicas y bioquímicas diferentes [112]. La PrP<sup>C</sup> está compuesta de ~40% de  $\alpha$ -hélice y ~3% de lámina- $\beta$ , siendo el resto de la estructura giros y zonas desestructuradas. En contraposición, la PrP<sup>Sc</sup> tiene un ~75% de lámina- $\beta$  y una ausencia total de  $\alpha$ -hélice, y el resto son giros y zonas desestructuradas [113]. La proporción de  $\alpha$ -hélice presente en la PrP<sup>Sc</sup> ha sido motivo de cierta

## INTRODUCCIÓN

controversia, ya que los primeros estudios realizados con FTIR calculaban un porcentaje de ~30%, el cual fue descartado, debido al surgimiento de técnicas más avanzadas como la resonancia magnética nuclear en estado sólido (RMN) [114, 115]. Como consecuencia de este cambio conformacional, la PrP<sup>Sc</sup> presenta otras características bioquímicas diferenciales como la resistencia parcial a PK [34] y su insolubilidad en detergentes no iónicos [33]. El tratamiento con PK elimina aproximadamente los 90 primeros aminoácidos de la PrP<sup>Sc</sup>, siendo este número dependiente de la compactación del núcleo de la fibra, y este a su vez dependiente de cepa [116]. La proteína digerida mantiene intacto un núcleo resistente de 27-30 kDa en comparación con el tamaño de 33-35 kDa que tiene la proteína completa. La solubilización de la PrP<sup>27-30</sup> en liposomas no disminuye su capacidad infectiva, demostrando así que las fibras amiloides no son las que portan la capacidad infectiva, sino que son los oligómeros de PrP<sup>Sc</sup> los que conforman los centros de nucleación que inician la propagación priónica [117]. En relación a esta última teoría, Silveira y colaboradores, realizaron un experimento donde desagregaron parcialmente la PrP<sup>Sc</sup> y las fracciones resultantes se separaron en relación a su tamaño y se inocularon en hámsteres. Las fracciones que resultaron más infecciosas fueron aquellas con un tamaño comprendido entre los 300 y 600 kDa, lo que equivalía a partículas compuestas por entre 14-28 moléculas de PrP. Este estudio sugirió que estos oligómeros son las moléculas que mayoritariamente están implicadas en la infección [118].

Experimentos de distinta índole han evidenciado que debe de existir una interacción directa entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> y que esta es necesaria para la propagación. Tanto los experimentos de Prusiner con ratones transgénicos que expresaban la PrP<sup>C</sup> de hámster junto con la PrP<sup>C</sup> propia de ratón [119], como los de Meier donde expresaban una PrP soluble y dimerica [120] o los de Engelke donde la PrP<sup>C</sup> presente en la célula estaba dimerizada [121], demuestran la existencia de un complejo PrP<sup>C</sup>/PrP<sup>Sc</sup> necesario para la conversión. No obstante, este complejo no se ha podido aislar por lo que se desconoce si existen más moléculas que participen o se unan a ese complejo [66]. La formación de este complejo viene favorecida cuando las secuencias aminoacídicas son idénticas o muy similares, explicando en parte el fenómeno de barrera de transmisión que existe entre especies. Este hecho que ponía de manifiesto el concepto de barrera de transmisión (ver explicación más adelante) se demostró con un experimento *in vitro*, donde se observaba que existía una interacción entre las PrP<sup>C</sup> de ratón y la PrP<sup>Sc</sup> de hámster y, con ello, la formación de un complejo entre ambas. Sin embargo, la tasa de conversión fue muy reducida, demostrando que las diferencias aminoacídicas existentes entre ambas especies tenían un papel más importante en el proceso de conversión que la unión inicial de ambas PrP. Esto sugirió que, además, tras la unión inicial entre ambas proteínas, siguen ocurriendo y son necesarias una diversidad de interacciones moleculares [122].

Debido a las limitaciones y a la escasa información que se tiene de los mecanismos moleculares que dirigen la conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>, actualmente se han descrito dos modelos puramente teóricos que describen el proceso de malplegamiento (figura 4).



**Figura 4. Representación esquemática de los modelos de conversión de priones.** a) Modelo de nucleación – polimerización b) Modelo de conversión inducida por molde. (Modificado de Corsaro 2012).

### 2.2.1 Modelo de conversión inducido por molde

Este modelo está basado en la teórica interacción entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup>, y el hecho de que esta última estaría actuando como molde en el proceso de malplegamiento de la PrP<sup>C</sup>. De esta forma, una conversión espontánea de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> estaría muy desfavorecida, ya que la barrera energética que requiere la conversión es muy alta. El hecho de que existan EET espontáneas y genéticas se explicaría de forma que la PrP<sup>C</sup> estaría en un equilibrio con un estado de la PrP llamada PrP\*, un estado conformacional intermedio transitorio cuya formación estaría catalizada por la unión entre la PrP<sup>C</sup> y una proteína X. La PrP\* a través de su unión con otras de su misma especie o con la PrP<sup>C</sup> conduciría a la formación de PrP<sup>Sc</sup>. Por otro lado, las EET adquiridas se desencadenan debido a la introducción de una fuente exógena de PrP<sup>Sc</sup> que actuaría como molde y las EET genéticas se explicarían por unos niveles de PrP\* anormalmente altos debido a un proceso de desestabilización promiscuo por parte de la PrP<sup>C</sup> y/o a un aumento de la estabilización del dímero PrP\*/PrP\*, que derivarían en un incremento de la PrP<sup>Sc</sup> que iniciaría la replicación. Finalmente, las EET esporádicas empezarían con la aparición de un evento muy infrecuente basado en la formación de un complejo PrP\*/PrP\* o una mutación somática que daría de forma

espontánea una PrP<sup>Sc</sup> y provocaría un aumento de la PrP\*, de tal modo que la enfermedad se empezaría a desarrollar igual que las EET hereditarias [34].

### 2.2.2 Modelo de nucleación-polimerización

En este modelo se parte de la premisa de que la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> están en un equilibrio termodinámico constante y reversible en solución. Debido a la inestabilidad de la PrP<sup>Sc</sup> monomérica, esta tendería a agregar con otras PrP<sup>Sc</sup> para poder estabilizarse, desplazando el equilibrio hacia la formación de más moléculas de PrP<sup>Sc</sup> [123]. El proceso está comprendido en dos fases: la primera de latencia en la que varias moléculas de PrP<sup>Sc</sup> agregan muy lentamente hasta llegar a la estabilización de los monómeros gracias a la creación de un núcleo o semilla multimérica, y la segunda fase, en la que se daría un crecimiento exponencial debido a que los monómeros de PrP<sup>Sc</sup> se irían uniendo al núcleo infeccioso, expandiéndolo. A medida que el núcleo va aumentando de tamaño, este sufriría una fragmentación que generaría varios núcleos infecciosos, los cuales a su vez empezarían una fase de crecimiento exponencial reclutando más moléculas de PrP<sup>Sc</sup>, favoreciendo la propagación del agente [124].

En la actualidad ningún modelo ha sido descartado ni confirmado, es decir, ambos modelos podrían ser totalmente válidos para explicar el proceso de conversión y propagación. Aunque hay varios factores que son desconocidos, como la existencia de una proteína X, la cual podría ser parte del complejo infeccioso o una molécula que ayudara al proceso de malplegamiento. La existencia de esta proteína nunca se ha podido demostrar y aunque en un principio se le asignó una naturaleza proteica, la obtención de priones recombinantes *in vitro*, en el cual solo intervinieron factores altamente purificados y definidos, señaló que este factor X, debía tratarse de otro tipo de molécula que actuase facilitando la conversión [57]. Otros experimentos que apoyan este modelo son aquellos que han demostrado la existencia *in vitro* de una especie intermedia entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> que sería la llamada PrP\* [125]. Por otro lado, hay algunas evidencias que apoyan el modelo de nucleación, entre estas evidencias destacan los modelos matemáticos [126] y los datos cuantitativos obtenidos en diferentes ensayos libres de células. Estos últimos denotan la necesidad de oligómeros más grandes que los dímeros de PrP<sup>Sc</sup> que, según el modelo de inducción por molde, iniciarían la propagación [118].

Sin embargo, recientemente han aparecido detractores que critican ambos modelos, alegando que no explican conceptos que suceden *in vivo*, como la heterogeneidad que existe entre cepas. Los experimentos de Béringue y colaboradores, explican la necesidad de la existencia de una suPrP en el proceso de replicación. Esta suPrP sería una subunidad oligomérica no infecciosa formada por un trímero ± un monómero con una alta resistencia a los agentes desnaturalizantes. Esta estructura sería muy estable su característica intrínseca sería la de contener los determinantes estructurales de cepa (SSD, del inglés, *strain structural determinant*). Esta suPrP sería una pieza elemental y necesaria en la propagación donde

la estructura cuaternaria sería el resultado de la condensación y la reorganización de la suPrP que dirigiría los ensamblajes formados por PrP<sup>Sc</sup> hacia una conformación determinada. Por tanto, la existencia de esta pieza fundamental, la SSD, durante la formación de los ensamblajes priónicos explicaría los determinantes estructurales que existen entre cepas, los mecanismos de molde existentes en la PrP<sup>Sc</sup> y su dispersión durante la replicación [127, 128].

### 2.3 PrP<sup>Sc</sup>

#### 2.3.1 Modelos estructurales

Actualmente, la estructura tridimensional de la PrP<sup>Sc</sup> se desconoce y como consecuencia está siendo objeto de muchos estudios. Conocer su estructura es clave para entender los procesos moleculares que tienen lugar durante la propagación priónica, la neurotoxicidad, así como los fenómenos de barrera de transmisión y de cepa. El estudio de la estructura de la PrP<sup>Sc</sup> entraña numerosas dificultades, siendo la más importante su composición molecular formada por diferentes polímeros de distinto tamaño en un equilibrio dinámico [118]. Por otro lado, la realización de este tipo de estudios estructurales a partir de muestras provenientes de encéfalos presenta la dificultad añadida de su adecuada purificación [129]. Otro problema añadido es la presencia de mezclas variables de formas sin glicosilar, mono y diglicosiladas [130]. Todo ello, dificulta enormemente los estudios biofísicos con técnicas de alta resolución como la cristalografía de rayos-X o la RMN [131].

A pesar de las limitaciones mencionadas, se han obtenido datos suficientes a partir de distintas técnicas, que han llevado a proponer distintos modelos estructurales y han acercado la resolución estructural de estos patógenos. Algunas de las primeras técnicas utilizadas fueron el dicroísmo circular y la espectroscopia FTIR, las cuáles se utilizaron para evaluar la composición de  $\alpha$ -hélice y lámina- $\beta$  presente en la PrP<sup>Sc</sup>. Estos estudios concluyeron con una presencia mayoritaria de lámina- $\beta$  en la PrP<sup>Sc</sup> respecto la PrP<sup>C</sup> en varias cepas y especies [112]. La proteólisis limitada también se ha utilizado para obtener información sobre la estructura de la PrP<sup>Sc</sup>, siendo la más utilizada la llevada a cabo con proteinasa K. La PK digiere un fragmento que equivale a aproximadamente los 90 primeros aminoácidos, siendo este dato variable y un reflejo de cuan compactado está el núcleo infeccioso y, por tanto, se utiliza para diferenciar y comparar diferentes cepas priónicas. Además, este procedimiento da lugar a otros fragmentos que permiten localizar lazos y giros dentro del núcleo compacto [132, 133]. Otra técnica que ha ofrecido mucha información sobre la estructura de la PrP<sup>Sc</sup> ha sido el mapeo de epítomos [62]. El estudio de accesibilidad de ciertas zonas de la PrP<sup>Sc</sup> utilizando diferentes anticuerpos que reconocen diferentes epítomos de la PrP, ha revelado que del aminoácido 90 al 120 se encuentra una zona inaccesible a no ser que se someta a agentes desnaturizantes y que, sin embargo, algunas regiones del extremo carboxilo, como las comprendidas entre los aminoácidos 152 - 163 o 225 - 231, se encuentran más expuestas a los anticuerpos [134]. Tanto la microscopía

electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electron microscopy*) [135], como la microscopía de fuerza atómica (AFM, del inglés *atomic force microscopy*) [136], y recientemente la criomicroscopía electrónica [137] han aportado detalles de la ultraestructura de las fibras amiloides de PrP<sup>Sc</sup>. Se pueden observar *prion rods* provenientes de encéfalo de forma nítida y bien definidos tras sucesivos y exhaustivos protocolos de purificación, lo que permite determinar algunas características estructurales. Pese a que no se ha podido llevar a cabo la correcta obtención de cristales de PrP<sup>Sc</sup>, sí que se han podido obtener patrones de difracción de baja resolución [138]. Tanto la cristalografía como la difracción de rayos X han sido ampliamente utilizados en estudios estructurales de diferentes amiloides que existen en la naturaleza [139]. Estos estudios mostraron un motivo estructural llamado spine o *cross-β-sheet* [140] que se ha propuesto también para la PrP<sup>Sc</sup>. Se denomina *cross-β-sheet* a una repetición de hojas β dispuestas perpendicularmente al eje longitudinal de la fibra. La difracción de rayos X de filamentos amiloides muestra un patrón característico con una señal vertical de 4.8 Å que indica la distancia entre las láminas-β apiladas a lo largo del eje vertical de la fibra, y otra horizontal de ~10 Å que muestra la distancia entre láminas-β adyacentes [139]. Se ha postulado que las estructuras de *cross-β-sheet* podrían ser diferentes para cada una de las distintas fibras de PrP<sup>Sc</sup>, lo que respaldaría la existencia de cepas [141]. Otra metodología de gran valor en el estudio estructural de los priones se basó en la técnica de intercambio hidrógeno-deuterio acoplada a la espectroscopía de masas (HXMS del inglés, *hydrogen–deuterium exchange mass spectrometry*). Su uso ha permitido observar que la estructura de la PrP<sup>Sc</sup> muestra giros y láminas β desde el aminoácido 90 aproximadamente con una total ausencia de α-hélices [114].

Todos los datos obtenidos tras el uso de las diferentes técnicas de baja resolución han permitido desarrollar diferentes modelos estructurales teóricos para la PrP<sup>Sc</sup> (figura 5).

### Modelo de hélice-β

Este modelo está basado en los datos de microscopía electrónica (ME), y en una estructura de hélice-β levógira. La unidad básica de la PrP<sup>Sc</sup> de este modelo estaría constituida por trímeros, donde los residuos ~90 al 175 de la PrP<sup>27-30</sup>, estarían formando hélices-β levógiras, que estarían apiladas horizontalmente e incluirían una zona desestructurada compuesta por los residuos del 145 al 163. El crecimiento de estos agregados llevaría a un apilamiento de los trímeros verticalmente a lo largo del eje de la hélice [131, 142] (figura 5<sup>a</sup>). Una de las mayores debilidades de este modelo es que la zona de los puentes disulfuro (Cys 179 - Cys 214) se considera que está en un estado de α-hélice y los estudios de FTIR han descartado casi con total seguridad la presencia de α-hélices en la estructura de la PrP<sup>Sc</sup> [113].

### Modelo de láminas β paralelas en registro

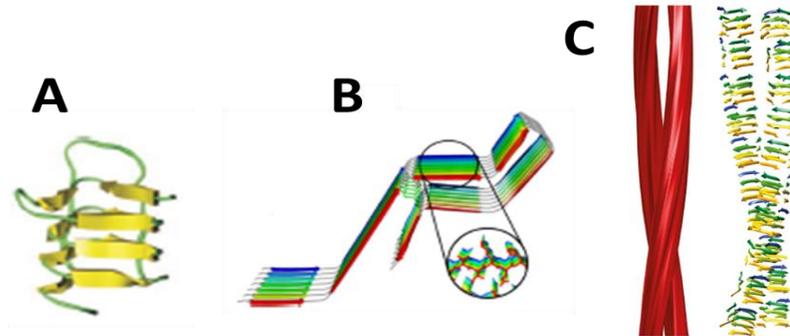
## INTRODUCCIÓN

Este modelo propone una estructura formada por láminas- $\beta$  paralelas que se disponen en registro, permitiendo un crecimiento infinito de las fibras, y donde cada molécula contribuye con 4.8 Å a la altura de la fibra [143](figura 5b). Datos obtenidos en estudios de HXMS y RMN de estado sólido utilizando PrP<sup>Sc</sup> proveniente de encéfalo y PrP recombinante apoyan este modelo de lámina paralela en registro. Además, estos han permitido determinar la arquitectura básica de los multímeros sin proveer de estructuras a nivel atómico [144]. Modelos *in silico* de dinámica molecular (MD, del inglés *molecular dynamics*) respaldan también los datos obtenidos. Estas simulaciones revelan que los residuos ~124 - 227 están más predispuestos a sufrir un empaquetamiento que los del ~90 - 123 (N-terminal) [115]. Sin embargo, los datos de difracción de rayos X contradicen el modelo, ya que, mediante esta técnica, tanto en la PrP<sup>Sc</sup> como en la PrP<sup>27-30</sup>, se puede observar una unidad de 19.2 Å que se repite y que no debería aparecer si este modelo fuera el correcto al estar formado por unidades de 4.8 Å [113].

### Modelo de láminas $\beta$ en solenoide de cuatro pisos

Este modelo está basado en datos obtenidos a partir de estudios de criomicroscopía electrónica, difracción de rayos X y proteólisis limitada. El modelo muestra una estructura basada en el apilamiento de láminas- $\beta$  sobre sí mismas formado un solenoide de cuatro niveles (figura 5c). Cada solenoide equivaldría a una molécula de PrP<sup>Sc</sup> y estas, distribuidas una encima de otra, formarían un protofilamento. A su vez cada protofilamento estaría asociado a otro protofilamento formando una hélice [137]. Estudios de difracción de rayos X realizados por Wille y colaboradores a partir de PrP<sup>27-30</sup> purificada de encéfalos de ratón infectados mostraron la existencia de repeticiones de 19.2 Å que coinciden con cuatro veces la unidad de 4.8 Å, una señal característica de las fibras amiloides [145]. Además, esta metodología también evidencia la ausencia de la unidad de ~10 Å en las muestras de PrP<sup>Sc</sup> provenientes de encéfalo, en contraposición a lo observado con las muestras de recPrP. La ausencia de esta señal supone un fuerte respaldo a este modelo dado que esta señal se observa de forma muy característica en las estructuras consistentes en láminas- $\beta$  paralelas en registro [145, 146]. Por otro lado, los estudios estructurales basados en criomicroscopía electrónica también han aportado datos que apoyan este modelo. Vázquez-Fernández y colaboradores observaron las mismas unidades repetitivas de 19.2 Å utilizando una PrP<sup>27-30</sup> que carecía del anclaje GPI tras ser purificada a partir de encéfalos de ratón transgénicos específicos [137]. Finalmente, el uso de la técnica de proteólisis limitada tanto en muestras de PrP<sup>Sc</sup> purificada a partir de encéfalos como en priones recombinantes infecciosos ha permitido obtener datos relevantes que apoyan este modelo [133, 147].

Los modelos que se barajan no solo deben ceñirse a los datos que las diferentes técnicas proporcionan, sino que deben ser modelos que se ajusten a la realidad. En este aspecto debemos mencionar la glicosilación que posee la PrP<sup>Sc</sup> dado que hay que tener en cuenta qué modelo encaja mejor con la presencia de glicanos de una longitud variable. Así, de los tres modelos descritos, el modelo de láminas- $\beta$  en solenoide es el que mejor encaja con los glicanos presentes *in vivo* [148] [144].



**Figura 5. Representación de los diferentes modelos estructurales de PrP<sup>Sc</sup>.** a) Modelo de  $\beta$ -hélice. (Modificado de Govaerts 2004). b) Modelo de lámina- $\beta$  paralela en registro. (Modificado Cobb 2007). c) Modelo de lámina- $\beta$  en solenoide en cuatro niveles. (Modificado de Requena 2018).

#### 2.4 Fenómeno de cepa

Uno de los conceptos más discutidos y que más controversia ha generado en el marco de la hipótesis de “solo proteína” es la existencia de cepas de priones. Esto era debido a que resultaba difícil explicar que una misma secuencia aminoacídica diera como resultado diferentes fenotipos cuando son transmitidos a un mismo hospedador. Estas características fenotípicas se evidencian tanto en los signos clínicos, como en el perfil de lesiones histopatológico, los tiempos de incubación, patrón de depósitos de proteína agregada y áreas neuronales específicas en las que aparecen los depósitos de proteína malplegada [149]. La evaluación de los tiempos de incubación y el perfil de lesiones son los métodos más utilizados para la clasificación e identificación de cepas [150].

De acuerdo con la hipótesis de “solo proteína”, el fenómeno de cepa se explicaría a través de la existencia de diferentes conformaciones que darían lugar a los diversos fenotipos. Estas diferencias se basarían en cambios de la estructura secundaria y/o terciaria de la proteína. Uno de los primeros estudios acerca de este fenómeno es el realizado por Bessen y colaboradores donde se caracterizan dos cepas de hámster. Estas cepas, denominadas *Hyper* (HY) y *Drowsy* (DY), se manifestaban con dos fenotipos completamente distintos y, además, después de la purificación de la PrP<sup>Sc</sup> del encéfalo de animales infectados con cada una de estas cepas, se observaron variaciones entre ambas en cuanto a la velocidad de sedimentación y la resistencia de cada cepa al tratamiento con agentes desnaturalizantes [151]. Posteriormente, utilizando las mismas cepas, se observó que tras el tratamiento con PK, se generaban dos núcleos resistentes de diferente tamaño según su patrón electroforético [152]. Dado que ambas cepas poseían la misma secuencia aminoacídica, las diferencias se debían a que cada una poseía una conformación diferente, de

modo que en una de ellas aparecía una región más expuesta a la digestión por PK en comparación con la otra. Aunque la existencia de variantes conformacionales explica las características observadas, debido a que en la actualidad todavía no se conoce la estructura de la PrP<sup>Sc</sup> al detalle, no se ha podido verificar cómo estos cambios estructurales entre cepas dirigen la manifestación fenotípica de la enfermedad.

Otro rasgo distintivo y específico de cepa es el porcentaje de PrP no glicosilada, monoglicosilada y diglicosilada que presentan cada una. La proporción de las formas glicosiladas es estable y se mantiene a través de los múltiples pases de inoculación seriados *in vivo* [153] e *in vitro* [154]. Lo que indica que el patrón de glicosilación parece ser relevante y podría estar implicado, junto con la estructura de la PrP<sup>Sc</sup>, en la existencia de las diferentes cepas priónicas. El patrón de movilidad electroforética junto con el de glicosilación de la PrP permite discernir entre dos grupos de cepas priónicas: las cepas clásicas y las atípicas. Las cepas clásicas presentan el patrón de tres bandas correspondientes con cada una de las formas de glicosilación en diferentes proporciones, y las cepas atípicas que, además de presentar las tres bandas características en algunos casos, también muestran fragmentos internos resistentes a PK y escindidos de los extremos amino y carboxilo terminal de entre 6 y 8 kDa, dependiendo del tipo de cepa. Las cepas atípicas han sido descritas en humanos, tanto en GSS [155] como en VPSPr [36], así como en pequeños rumiantes, con la cepa atípica de *scrapie* Nor98 [156].

Otra de las características más significativas de las cepas priónicas es su tropismo celular diferencial. Esta propiedad les permite propagarse y, por tanto, afectar a determinadas áreas del SNC, resultando en distintos patrones de depósito de PrP<sup>Sc</sup> y signos clínicos. A pesar de que este acontecimiento se ha estudiado ampliamente en varias líneas celulares capaces de propagar distintas cepas priónicas, aún se desconocen los mecanismos moleculares que explicarían este tropismo celular [157]. Se ha hipotetizado que el comportamiento intrínseco de cada cepa podría estar definido por la estructura que presenta esta y su capacidad de unirse o interactuar con moléculas específicas, como por ejemplo receptores neuronales. Por ello, su capacidad de propagación se vería afectada acorde a los distintos tipos celulares [66]. Esta hipótesis pone de manifiesto la importancia de la interacción de la PrP con distintos cofactores presentes en el encéfalo, ya sean chaperonas, especies de ARN, entorno lipídico particular, etc. [158].

El fenómeno de cepa tiene especial relevancia cuando se trata de diseñar diferentes estrategias terapéuticas, dado que en el caso de compuestos químicos que se unen a la PrP<sup>Sc</sup> con el fin de bloquear su propagación, su eficacia podría verse afectada en función de cómo estos ejercen su acción sobre los diferentes conformeros estructurales. Esto puede traducirse en que compuestos que muestran actividad antiprionica frente a determinadas cepas, no la muestren ante otras o incluso que favorezcan la formación de isoformas o cepas resistentes a determinados compuestos tras su selección [159-162].

### 2.5 Barrera de transmisión

La capacidad de transmisión de los priones entre diferentes especies se conoce desde prácticamente el inicio del descubrimiento de las EET, cuando Gadjusek y colaboradores, infectaron con kuru a chimpancés

induciéndoles la enfermedad [12]. También, se ha observado la transmisión de priones procedentes de diferentes especies a humanos, fenómeno conocido como zoonosis. La zoonosis mejor estudiada es la transmisión del agente causal de la BSE a humanos causando la vCJD [163]. Debido a la relevancia de este fenómeno desde el punto de vista de la salud pública, la transmisión entre especies ha sido extensamente estudiado utilizando diferentes modelos animales transgénicos que expresan la PrP de distintos mamíferos [164].

La propagación de priones entre diferentes especies está restringida por un fenómeno denominado barrera de transmisión o de especie. El fenómeno se observa cuando las cepas de priones infectan especies diferentes de las que proceden, manifestando períodos de incubación más largos y/o una tasa de ataque incompleta (no todos los animales se infectan y, por tanto, no desarrollan la enfermedad) [165]. Conforme se realizan pases seriados en el nuevo huésped, los tiempos de incubación y tasas de ataque se van reduciendo y aumentando, respectivamente. Durante este proceso, las cepas normalmente sufren un proceso de adaptación a la nueva especie. El número de pases necesarios para lograr una estabilización completa de la cepa priónica en la nueva especie huésped permite también evaluar el grado de barrera de transmisión que existe.

Inicialmente, aún sin haberse descubierto la proteína del prion, el efecto de barrera se explicó a través de la suma de dos factores implicados: la eficiencia de conversión y la patología causada por la cepa seleccionada [166]. Tras la demostración de que se requería únicamente la existencia de una proteína, la explicación de este fenómeno se enfocó en las diferencias que esta presentaba en su secuencia aminoacídica entre la especie donante y la receptora [164]. Para llevar a cabo los estudios iniciales con el fin de demostrar esta hipótesis, se utilizaron ratones transgénicos que expresaban la PrP<sup>C</sup> de hámster junto con la proteína endógena de ratón y estos fueron infectados con cepas de ambas especies. Aquellos animales que se infectaron con priones de ratón mostraron mayoritariamente agregados de PrP<sup>Sc</sup> de ratón, mientras que los animales infectados con priones de hámster mostraban agregados formados principalmente por PrP<sup>Sc</sup> de hámster [119]. La existencia de variantes polimórficas y cómo estas afectan al fenómeno de barrera de transmisión, es otra demostración de la importancia de la similitud de la secuencia aminoacídica entre la cepa donante y la receptora. Uno de los ejemplos más conocidos es el caso de los genotipos *a* y *b* existentes en ratones, y cuya diferencia es de dos aminoácidos en la secuencia de la PrP, pero sus tiempos de incubación son significativamente diferentes frente a las mismas cepas [167]. Todos estos estudios han dejado patente que el fenómeno de barrera de especie está determinado no solo por la especie sino el tipo de cepa priónica. De tal forma que dos cepas provenientes de la misma especie y con la misma secuencia aminoacídica, podrían tener diferentes capacidades a la hora de superar la barrera de transmisión e infectar a otras especies [168].

### 2.6 Patogenia

Otro aspecto relevante de las EET es la identificación de los mecanismos de neurotoxicidad que ocasionan la neurodegeneración característica de estas enfermedades. Los estudios de los primeros modelos murinos

*knock out* para la PrP, demostraron que la neurodegeneración no viene como consecuencia de la ausencia de PrP<sup>C</sup> o por la pérdida de su función debido a su conversión en PrP<sup>Sc</sup> [169]. En 2007, el grupo de Giovana Mallucci utilizando modelos murinos con expresión condicional de PrP<sup>C</sup> observó que, en animales con una infección priónica establecida, la eliminación de la PrP<sup>C</sup> revertía los efectos neurotóxicos de las fases iniciales, evitando la pérdida neuronal, la progresión de la enfermedad y mostrando signos de recuperación. Cabe reseñar que los agregados amiloides de PrP<sup>Sc</sup> presentes en los animales a los que se desactivaba la expresión de PrP<sup>C</sup> eran iguales a los animales con PrP<sup>C</sup> en estadios terminales de la enfermedad [170]. Esto deja constancia de la necesidad de la presencia de PrP<sup>C</sup> para que la neurotoxicidad tenga lugar. Hecho que también se puede observar en los experimentos donde modelos murinos sin PrP, a los cuales se les injertaba en el encéfalo un tejido neural con PrP<sup>C</sup>, solo desarrollaban neurodegeneración en la zona del injerto [171]. De forma similar, los estudios realizados con modelos animales que expresan la PrP sin GPI, donde hay una significativa acumulación de PrP<sup>Sc</sup>, muestran una neurodegeneración es mínima, lo que respalda la necesidad de una PrP<sup>C</sup> anclada a la membrana para que se dé este efecto [172]. Así mismo, se ha observado una gran neurodegeneración, pero niveles mínimos de agregados de PrP<sup>Sc</sup>, tanto en animales [173] como en humanos [174]. Estos resultados indican la existencia de una disociación entre la presencia de agregados amiloides y neurotoxicidad y sugieren que la responsable de esta última podría ser una interacción entre la PrP<sup>C</sup> y pequeños multímeros de PrP<sup>Sc</sup> o incluso formas intermedias que se generarían en los procesos de malplegamiento y formación de grandes fibras amiloides.

El hallazgo de diversas formas oligoméricas intermedias durante la amilogénesis de la PrP [175] y posteriores estudios donde se demuestra que oligómeros solubles de un determinado tamaño son las formas con mayor capacidad infectiva [118], descartan las fibras de mayor tamaño como responsables de la neurodegeneración. Experimentos llevados a cabo *in vivo* e *in vitro* confirman que son las formas multiméricas de menor tamaño las responsables del daño neurológico y no las fibras [176]. Sin embargo, los mecanismos que desencadenan la neurotoxicidad o las interacciones dirigidas, en principio, mediadas por la PrP<sup>C</sup>, todavía se desconocen. Estudios recientes han demostrado que otras proteínas relacionadas con enfermedades neurodegenerativas como la  $\alpha$ -sinucleína en el párkinson o el péptido  $\beta$ -amiloide en el alzhéimer, presentan también especies oligoméricas malplegadas como responsables de la neurodegeneración, siendo estas las formas más neurotóxicas [177, 178].

A pesar de que todavía se desconocen los mecanismos moleculares que inician esta toxicidad y neurodegeneración, hay diferentes estudios que han sugerido el papel de ciertos procesos celulares que intervienen como resultado de la infección por priones y que podrían estar relacionados con la toxicidad asociada a este proceso de malplegamiento proteico.

### Afectación del sistema de autofagia

La autofagia es el mayor mecanismo de eliminación de proteínas agregadas o disfuncionales, por el cual determinadas macromoléculas citoplasmáticas u orgánulos completos son dirigidos a los lisosomas para

ser degradados. La estructura donde ocurre la degradación se llama vacuola autofágica o autofagosoma. Se ha demostrado que, si los niveles de proteína agregada son muy elevados, el autofagosoma puede iniciar una cascada de señalización para inducir la muerte celular y, consecuentemente, producir daño y muerte neuronal [179-181]. Este tipo de vacuolas han sido observadas en diferentes modelos animales a los que se les ha inducido una enfermedad priónica, así como en individuos afectados por alguna EET humana [180, 182, 183]. A pesar de estos prometedores estudios, todavía se desconoce si la PrP<sup>Sc</sup> tiene un efecto tóxico disminuyendo la actividad autofágica o, por el contrario, la inducción de la autofagia resulta neuroprotectiva como consecuencia de un incremento en la eliminación de la PrP malplegada, que evita una cascada de señalización que sería tóxica para la célula [184-186].

### Inducción del sistema de apoptosis

La apoptosis se define como la muerte celular programada, un mecanismo necesario para el correcto funcionamiento celular. Es un proceso activo y controlado que difiere totalmente de la necrosis incontrolada [187]. El mecanismo de apoptosis se ha observado tanto en modelos experimentales como en pacientes de EET [188, 189]. Aunque el papel de la apoptosis en la infección por priones es desconocido, se ha demostrado que la delección de genes que codifican Bax, una proteína que favorece la apoptosis, así como la sobreexpresión de Bcl-2, la cual tiene una importante actividad antiapoptótica, no tienen ningún efecto. Lo que sugiere que las rutas apoptóticas mediadas por Bcl-2 y Bax no contribuyen de forma esencial en el desarrollo de la enfermedad y posterior muerte neuronal que tiene lugar durante una infección por priones [190, 191].

### Inhibición del sistema ubiquitino-proteosómico

El sistema ubiquitino - proteosómico (UPS, del inglés *ubiquitin proteasome system*) es el principal mecanismo que tienen las células de mamífero para degradar proteínas. La degradación proteica mediada por UPS ocurre en dos fases, la primera donde la proteína se conjuga con moléculas de ubiquitina, marcándola; y la segunda, donde la proteína ubiquitinada es degradada por la unidad 26S del proteasoma [192]. Se ha observado una alteración del UPS en las etapas iniciales de la infección por priones acompañado por la acumulación de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> que precede a la pérdida neuronal [193]. Un estudio demostró que los oligómeros de PrP<sup>Sc</sup> se unían a la subunidad 20S del proteasoma reduciendo la entrada a este y, por tanto, reduciendo su capacidad de degradación [194]. También, se ha descrito una relación directa entre la neuropatología y una actividad deficiente del UPS [195], por lo que ha sido considerado como una posible diana terapéutica.

### Respuesta a proteínas malplegadas

La respuesta a proteínas malplegadas (UPR, del inglés *unfolded protein response*) es un mecanismo de estrés celular que se dispara con el aumento de proteínas malplegadas o desplegadas. La UPR está controlada por determinadas cascadas de señalización que comienzan en la membrana del retículo

endoplasmático (RE). Estas cascadas están reguladas de manera independiente, siendo la más importante aquella que se regula a través de una quinasa llamada PERK (del inglés, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase* [196]). La fosforilación de la proteína PERK disminuye la traducción proteica a través de la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (del inglés, *Eukaryotic translation initiation factor 2*) con el fin de evitar la producción masiva de proteínas malplegadas. En consecuencia, se activan genes de respuesta al estrés que, a su vez, se regulan a través de la proteína GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible 34*), la cual reduce la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y restaura la traducción proteica [197].

Algunos estudios han observado una cascada de señalización aberrante mediada por la UPR durante la progresión de una enfermedad priónica, así como la posterior muerte neuronal [198-200]. Se ha observado que cuando se infecta con priones ciertos modelos murinos sobreexpresadores de PrP, estos desarrollan una respuesta aberrante del mecanismo UPR, que desemboca en una activación de PERK y una fosforilación de eIF2 $\alpha$  que acaba en una pérdida neuronal [198]. Por otro lado, cuando se fuerza la expresión de GADD34, se reduce la fosforilación de eIF2 $\alpha$ , se recuperan los niveles normales de traducción y se evita la neurodegeneración [200]. Estos datos sugieren que la disminución de la síntesis proteica mediada por PERK en el desarrollo de la infección priónica tiene un papel decisivo en la neurodegeneración. Por el contrario, cuando la cascada de señalización mediada por PERK se inactiva o reduce, se puede observar un efecto de neuroprotección, a pesar de que la replicación de la PrP<sup>Sc</sup> no se vea afectada [181].

### Aumento del proceso de estrés oxidativo

El aumento del estrés oxidativo celular y las EET se han relacionado en un gran número de estudios, sin embargo, aún se desconoce si la progresión de la enfermedad causa el estrés oxidativo o es el estrés oxidativo el que promueve la progresión de la enfermedad [181]. Un estudio realizado por Choi y colaboradores demostró que, en hámsteres infectados con *scrapie* se observaban mitocondrias de las neuronas del hipocampo y el córtex cerebelar con anomalías estructurales, sugiriendo que el estrés oxidativo era el responsable del mal funcionamiento mitocondrial causando con ello un aumento de la neurodegeneración [201].

### Afectación de la microglía

La microglía es un conjunto de células responsables de parte de la respuesta inmunológica en el SNC que actúan principalmente a través de su actividad fagocítica. Aunque desempeña un papel fundamental en la defensa y mantenimiento del SNC, su activación puede tornarse perjudicial debido a su efecto neurotóxico [202]. Se ha observado que la activación de la microglía sigue un patrón y curso temporal paralelo a la acumulación de la PrP<sup>Sc</sup>. Además, la activación de esta precede la muerte neuronal, sugiriendo que la activación de la microglía podría estar relacionada con la neurotoxicidad [203]. Por otro lado, Carroll y colaboradores observaron que, reduciendo al mínimo los niveles de microglía presentes en el córtex durante una fase temprana de la infección, se aceleraba la vacuolación, la astrogliosis y el

acúmulo de PrP<sup>Sc</sup>. Adicionalmente, los animales que no presentaban microglía tenían signos clínicos avanzados que requería de una eutanasia 33 días antes de aquellos que sí presentaban microglía activada. Estos resultados sugieren que el papel de la microglía sería beneficioso durante la infección priónica a través de la eliminación de la PrP<sup>Sc</sup> presente [202].

### 3 Encefalopatías espongiformes transmisibles humanas

Las EET son enfermedades neurodegenerativas que comparten agente causal y caracterizadas por cambios neuropatológicos producidos por la acumulación de fibras amiloides en diferentes áreas del encéfalo.

Debido a que la patogénesis de estas enfermedades está directamente relacionada con la conversión de la PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>, muchos de los estudios que se han realizado sobre las EET humanas se han enfocado en comprender los factores que desencadenan el inicio de este proceso de conversión, así como la variabilidad entre individuos que padecen un mismo síndrome. Un factor determinante para la susceptibilidad genética a estas patologías parece estar controlado por un polimorfismo en el codón 129 del gen *PRNP* que codifica la proteína del prion. El codón codifica la metionina (M) o valina (V) dando lugar a tres variantes alélicas: homocigosis para metionina (129M), homocigosis para valina (129V) o heterocigosis (129M/V) y cuya frecuencia en la población es variable [204]. Se ha observado que estas variables alélicas presentan una mayor o menos susceptibilidad a determinadas enfermedades priónicas y tienen implicación en el desarrollo de signos clínicos específicos [205], por lo que resultan de especial interés al hablar de EET humanas.

Las EET pueden mostrarse con una gran variedad de manifestaciones clínicas, por ello, una de las formas de clasificación más comunes es teniendo en cuenta su etiología y las características patológicas que presentan, clasificándose en EET genéticas, adquiridas y esporádicas (Tabla 1).

**Tabla 1. Clasificación etiológica de las encefalopatías espongiformes transmisibles humanas.**

Etiología	Enfermedad
EET genéticas	Enfermedad de Creutzfeldt Jakob genética (CJD) Insomnio Familia Fatal (FFI) Enfermedad de Gerstmann-Straüssler-Scheinker (GSS)
EET adquiridas	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob iatrogénico (iCJD) Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCJD) kuru
EET esporádicas	Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádico (sCJD) Insomnio Familiar esporádico (sFI) Prionopatía con Sensibilidad variable a Proteasas (VPSPr)

### 3.1 Encefalopatías espongiformes transmisibles genéticas

Las EET genéticas, también llamadas hereditarias o familiares, representan aproximadamente un 10 - 15 % de los casos totales. Estas patologías están directamente relacionadas con mutaciones autosómicas dominantes en el gen que codifica la PrP (*PRNP*) y cuya penetrancia entre individuos es heterogénea [206]. Entre las patologías descritas se encuentran la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob genética (gCJD, del inglés, *genetic CJD*), el insomnio familiar letal (FFI) y el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS). Actualmente hay descritas más de 60 mutaciones en el gen de la *PRNP* relacionadas con el desarrollo de alguna EET [38], incluyendo mutaciones puntuales, inserciones, deleciones en la zona de las octarepeticiones y PrP<sup>C</sup> incompletas por la aparición de codones de terminación prematuros [205].

La gCJD corresponde a entre el 5-15% de todos los casos de CJD diagnosticados. Aunque el origen hereditario de esta enfermedad se conoce desde principios del siglo XX, no se asociaron a mutaciones en la PrP hasta 1989 [207, 208]. Aunque la frecuencia de mutaciones en la población varía, hay ciertos grupos geográficos o étnicos donde existe cierta prevalencia de determinadas mutaciones puntuales como la: E200K, V210I, D178N y V180I, siendo la E200K y la V210I las variantes más comunes en Europa [209, 210]. Por otro lado, están las gCJD provocadas por inserciones en la zona de las octarepeticiones. La *PRNP* humana tiene una zona de nueve péptidos PQGGGTWGQ seguida por una repetición en tándem de cuatro copias del octapéptido PHGGGWGQ. Estas repeticiones están localizadas entre los residuos 51 y 91. La estructura normal de estas cinco repeticiones ha sido descrita así: R1-R2-R2-R3-R4, siendo R1 el que codifica para el nonapéptido y las estructuras del R2 al R4 las que codifican para una estructura de octapéptido que tiene la siguiente fórmula P(H/Q)GGG(-/G)WGQ. Los individuos con una inserción en la sección de octarepeticiones (OPRI, del inglés *octa-peptide repeat insertion*) pueden poseer desde una hasta doce octarepeticiones adicionales en el gen [79, 211]. Cabe mencionar que los individuos con hasta 4 repeticiones extra suelen tener un fenotipo similar a los casos de CJD esporádicos [212], en cambio en los individuos que tienen más de 4 repeticiones extra, su fenotipo suele recordar a los que sufren GSS o demencia atípica [213].

La aparición de las primeras manifestaciones ocurre entre los 33 y los 85 años, siendo la media de edad ~60 años y la duración de la fase clínica hasta el fallecimiento oscila entre unos meses hasta varios años siendo la media de aproximadamente 5 meses [205]. Como se ha mencionado anteriormente, el fenotipo clínico-patológico en esta enfermedad se correlaciona en gran medida con el genotipo del codón 129. Las mutaciones en el gen de la *PRNP* pueden jugar un papel importante en la patogénesis de las gCJD incrementando la probabilidad de malplegamiento de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup>, la retención de agregados de PrP en las vías secretoras y/o modulando los puentes de sal intramoleculares y de interacciones de enlaces de hidrógeno. Se ha observado en la tipificación bioquímica de cepas que, en las gCJD, normalmente, se muestra un menor número de fragmentos no glicosilados [214]. En los casos de gCJD, los análisis bioquímicos por *Western blot* muestran mayoritariamente un patrón electroforético similar a los casos de CJD esporádico (tipo 1A o 2A), en el caso específico de la mutación E200K, se suele observar un patrón

de tipo 1B o 1A/B (los diferentes patrones electroforéticos y su clasificación se explicarán más adelante en la sección de enfermedades priónicas esporádicas). Por otro lado, las gCJD tienen una neuropatología característica que ayuda a su clasificación dado que los encéfalos de los individuos afectados muestran un cambio esponjiforme variable y una pérdida neuronal acompañada de astrogliosis. En los datos de inmunohistoquímica se observan unos depósitos lineales de PrP en la capa molecular del cerebelo y estos son particularmente acusados en los casos de cuatro o más repeticiones en la zona de las octarepeticiones en el gen de la PrP [215, 216].

El insomnio familiar letal (FFI) es una EET genética que se caracteriza por la mutación D178N asociada a la metionina del polimorfismo 129 en el gen que codifica la PrP. Cabe destacar que cuando esta mutación está asociada a una valina en el mismo polimorfismo, se desarrolla un fenotipo de gCJD [214, 217]. El FFI tiene una incidencia igual en hombres y mujeres y no hay diferencias significativas entre los polimorfismos 129M y 129M/V. Sin embargo, la duración de la enfermedad sí depende del polimorfismo que se posea, variando desde los 6 hasta los 72 meses, siendo la media significativamente más corta en los sujetos con el genotipo 129M, de unos 11 meses, en comparación con la media de los 129M/V, que es de 23 meses [218]. La aparición de los primeros signos clínicos ocurre a una edad de entre los 20 y los 72 años, con una media de aparición a los 49 años. Entre los varios signos clínicos, destacan el insomnio y sueño interrumpido, además de mioclonía, ataxia, disartria, disfagia e hiperactivación autonómica [207]. Aunque los signos relacionados con el insomnio son un rasgo distintivo del FFI, estudios recientes indican que hay pacientes que cursan sin signos de insomnio [218, 219]. Diferentes observaciones han señalado que la gravedad de los signos clínicos también varía dependiendo del genotipo del codón 129, señalando que el hecho de ser homocigoto para metionina (129M) está relacionado con un fenotipo típico de FFI [219]. Los sujetos con FFI exhiben de forma distintiva una fuerte astrogliosis talámica acompañada de una pérdida neuronal severa más evidente en el núcleo talámico anterior. A diferencia de otras EET, la espongirosis es difícil de detectar y se encuentra limitada principalmente al cerebelo. Finalmente, el patrón electroforético que se observa en las muestras de FFI suele ser de tipo 2A/B [215, 216].

Por último, el síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS) es otra EET genética, cuya incidencia es de aproximadamente 5 casos por cada 100 millones al año [207]. Se caracteriza por un inicio de la enfermedad temprano que va desde los 30 años a los 60 y una progresión de la enfermedad lenta, cuya duración puede variar desde 3.5 a 9.5 años [205]. Como en la gCJD, el GSS puede estar causado por mutaciones de distinta índole. Entre las mutaciones puntuales asociadas a este síndrome destacan las siguientes: la P102L, P105L, A117V, F198S y Q217R siendo la P102L la más común [207]. Mencionar, también, la existencia de GSS causadas por un codón de terminación prematuro como la Q227X o la Y226X [220] o las causadas debido a inserciones en la región de las octarepeticiones, las cuales suelen ser inserciones de más de 100 pb [211]. Con relación a las manifestaciones clínicas, estas varían entre individuos e incluyen: ataxia cerebelar prominente, alteraciones de la marcha, demencia, disartria, dismetría ocular, mioclonía infrecuente, paraparesia espástica, signos parkinsonianos, e hiporreflexia o arreflexia en las extremidades inferiores [207, 221]. Respecto a la neuropatología, la característica más

reseñable es la presencia de placas amiloides multicéntricas en el córtex cerebelar, siendo la espongiosis variable en su gravedad y distribución, pudiendo no aparecer. Algunas mutaciones pueden mostrar determinadas características neuropatológicas como el caso de la mutación F198S donde se observan nudos neurofibrilares en el córtex cerebral. Por último, en relación con su patrón electroforético en *Western blot*, las muestras de GSS suelen mostrar un patrón de tipo 1B, 1A/B o caracterizado por un fragmento de 7-8 kDa, siendo este último conocido como patrón atípico [211, 215, 216].

### 3.2 Enfermedades espongiiformes transmisibles adquiridas

Las EET adquiridas son aquellas que se relacionan con la introducción exógena del agente infeccioso ya sea a través de prácticas médicas (origen iatrogénico) o por la ingestión de material contaminado. Con relación a las EET iatrogénicas, fueron descritas por primera vez en el año 1974 en una persona que recibió un trasplante de córnea proveniente de un donante con CJD [222]. Desde entonces, los diferentes casos descritos han sido asociados con trasplantes de duramadre o córnea procedentes de donantes enfermos, el uso de material quirúrgico contaminado, electrodos electroencefalográficos o el tratamiento con hormona del crecimiento que provenía de la hipófisis de cadáveres infectados [223]. Existen más de 492 casos de CJD iatrogénico, siendo la mayoría (>400) originados por los trasplantes de duramadre y los tratamientos de hormona del crecimiento humana [224, 225]. La edad a la que aparece la enfermedad en estos casos va desde los 26 hasta los 76 años, con una media de 58 años y cuya duración tiene una media de ~16 meses [224]. Los signos clínicos varían dependiendo de la ruta de exposición; si la infección fue por vías cercanas al SNC (p.ej.: trasplante de dura madre) los signos son parecidos al fenotipo de los que padecen CJD esporádico con una demencia progresiva rápida normalmente asociada a ataxia y mioclono. En cambio, si la ruta de exposición fue periférica (p. ej.: inyecciones intramusculares de hormona del crecimiento) se observa un síndrome atáxico progresivo y un deterioro cognitivo menos prominente y tardío [225, 226]. La neuropatología en los casos de neurocirugía o trasplantes de dura madre es similar a los casos de CJD esporádico, en cambio los que recibieron hormona del crecimiento, tienden a mostrar placas amiloides como las que aparecen en los que han sufrido kuru [227].

De origen adquirido, destacan dos enfermedades muy particulares, ya que se contraen debido a la ingesta de material infeccioso; una de ellas es el kuru, relacionada con rituales canibalísticos de la etnia *fore* que hoy en día se considera erradicada, y cuya característica neuropatológica distintiva es la presencia de numerosas placas amiloides distintivas, conocidas como placas de kuru, compuestas por un cuerpo sólido y un borde filamentosos [10]. La otra patología es la denominada variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vCJD) originada por la ingesta de carne bovina contaminada por priones causantes de BSE. Es una zoonosis descrita por primera vez en 1996 en 10 personas en el Reino Unido [163], aunque se han reportado casos en 8 países europeos y 4 no europeos, la mayoría de los casos sucedieron en el Reino Unido [208]. Las primeras manifestaciones de la enfermedad se observaron a edades muy tempranas respecto al resto de EET, con una media de 26 años y una duración media de 14 meses, que variaba entre los 6 y los 40 meses [224, 228]. Los signos clínicos incluyen agitación, agresión, depresión, ansiedad, apatía, labilidad emocional, insomnio, falta de concentración, delirio paranoico o imprudencia, algunos

individuos pueden mostrar signos de trastornos sensitivos tales como dolor, parestesia y disestesia [229]. Los signos neurológicos más acusados aparecieron de media 6 meses después de la aparición de los primeros signos, con manifestaciones como ataxia cerebelar, deterioro cognitivo, movimientos involuntarios que pueden ser distónicos, coreiformes o mioclónicos, incontinencia de orina, inmovilidad progresiva y mutismo acinético [230]. La neuropatología muestra un gran número de placas floridas en el córtex cerebral y el cerebelo [163], una gran acumulación de PrP<sup>Sc</sup> observable por inmunohistoquímica, una marcada espongirosis, así como una severa pérdida neuronal y astrogliosis en el tálamo. Los análisis por *Western blot* muestran un patrón electroforético de tipo 2B. Cabe mencionar que, aunque existen estudios que sugieren que los tres genotipos existentes del codón 129 de la *PRNP* podrían desarrollar la enfermedad [231, 232], hasta la fecha todos los casos de vCJD testados han sido homocigotos para metionina en el codón 129 (129M), salvo una excepción cuyo genotipo ha sido heterocigoto 129M/V [233].

Por otro lado, se han detectado cantidades importantes de PrP<sup>Sc</sup> en el sistema linforreticular (amígdala y apéndice vermiforme) de pacientes de vCJD pudiéndose utilizar para el diagnóstico de la misma incluso en sujetos clínicamente sanos (portadores) [234]. Un estudio llevado a cabo en pacientes en el Reino Unido demostró que la acumulación de priones en el sistema linforeticular es una característica consistente en los individuos con vCJD [235]. Sin embargo, esta característica no es común en todas las EET, siendo una particularidad de la vCJD y algunas EET de animales [236]. El papel del sistema linforeticular ha sido ampliamente estudiado en animales, observándose acúmulos de PrP<sup>Sc</sup> en estos órganos [237, 238] incluso en animales en estado preclínico de la enfermedad [239]. Además, la presencia de PrP<sup>Sc</sup> en estos órganos se ha demostrado que es dependiente de cepa y que existen ciertas cepas de priones que presentan tropismo por el sistema linforeticular, siendo este un tejido donde tiene lugar la replicación priónica que en el caso de EET adquiridas parece ser previa a la invasión del SNC y la propagación en el mismo [236, 240, 241].

### **3.3 Encefalopatías espongiiformes transmisibles esporádicas**

Las EET esporádicas son las EET más comunes en humanos ya que representan el 85% de los casos diagnosticados y se denominan así porque parecen ocurrir de forma espontánea desconociéndose aún la causa desencadenante. Entre ellas se encuentra la CJD esporádica (sCJD, del inglés, *sporadic CJD*), el insomnio letal esporádico (sFI, del inglés, *sporadic Fatal Insomnia*) y la prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (VPSPr).

La sCJD es la enfermedad priónica más común de este grupo con una incidencia anual de aproximadamente 1,5 casos por millón de habitantes [242]. Se han identificado casos en todo el mundo y su distribución es aleatoria [225]. La incidencia es igual en ambos sexos con un pico de edad de entre 55 y 75 años y una duración media de 8 meses [224]. Las manifestaciones clínicas clásicas son una demencia progresiva rápida, ataxia y mioclono, aunque también se han observado anomalías visuales, del habla y de la marcha, así como cambios de comportamiento como agitación, confusión y depresión [207]. Las

## INTRODUCCIÓN

observaciones neuropatológicas muestran cambios espongiiformes, una gliosis reactiva y acúmulos de PrP<sup>Sc</sup> [225]. Es importante reseñar que existen varios fenotipos clínico-patológicos y moleculares presentes en las sCJD, lo cual ha llevado a clasificar estos fenotipos basándose en el polimorfismo del codón 129 y el patrón electroforético que se observa por *Western blot*. Esta heterogeneidad se atribuye a las diferentes características bioquímicas de las cepas priónicas. La clasificación se hace teniendo en cuenta las combinaciones posibles del codón 129 y las isoformas de PrP<sup>Sc</sup> que se han observado bioquímicamente, dando lugar a 6 posibles combinaciones que son: MM1, MV1, VV1, MM2, MV2 y VV2 [243]. Sin embargo, no todos los casos de sCJD se pueden clasificar dentro de estos grupos y en los patrones electroforéticos se pueden apreciar variaciones ocasionales dentro de las dos isoformas, llevando a la necesidad de añadir subtipos [1A, 2A y 1+2 (A)] [244].

En cuanto a la forma esporádica del insomnio letal, fue descubierta en el año 1999 [245] y afecta a individuos con una media de edad de 46 años con una duración media de 24 meses. Los pacientes muestran síntomas muy parecidos a los pacientes de FFI, que incluyen insomnio y sueño interrumpido, pero también se pueden observar otros signos como mioclonía, ataxia, disartria, disfagia, signos piramidales e hiperactivación autonómica [246]. La incidencia es muy baja, solamente existen 33 casos confirmados [247]. El diagnóstico de sFI se basa en cuatro características; la primera es la presencia de una severa pérdida neuronal acompañado de una reacción astrogliar marcada en el núcleo talámico y sin degeneración espongiiforme, la segunda es una atrofia de carácter variable en las olivas inferiores, la tercera, la presencia de PrP<sup>Sc</sup> de tipo 2A, y la cuarta, que hasta la actualidad todos los casos descritos han sido 129M y sin mutaciones en el gen de la PrP [247].

La prionopatía con sensibilidad variable a proteasas (VPSPr) es una nueva forma de demencia atípica que fue descrita por primera vez en el año 2008 en 11 pacientes, la mayoría con una historia familiar de deterioro cognitivo [36]. Se estima que entre el 2-3% de las EET esporádicas son VPSPr, pero se cree que pueda estar infraestimada y clasificada como una demencia atípica. La aparición de esta enfermedad se da de alrededor de los ~70 años con una duración media de 24 meses [248]. La característica predominante de esta patología es que la PrP<sup>Sc</sup> presenta una menor resistencia al tratamiento por proteasas que en el resto de EET [36]. Las manifestaciones clínicas comprenden psicosis o cambios de humor, déficit del habla y disminución cognitiva [246]. Entre los pacientes de esta enfermedad podemos encontrar individuos con los tres genotipos del codón 129 (129M, 129M/V, 129V) siendo variable la sensibilidad frente a la digestión con PK que muestra la isoforma PrP<sup>Sc</sup> en función de este genotipo [249]. La neuropatología que se observa está caracterizada por la presencia de un cambio espongiiforme con vacuolas de tamaño intermedio y microplacas amiloides [216].

Cabe reseñar que la aparición de estas patologías esporádicas no ha podido ser relacionada con ninguna alteración genética, ni con ningún factor de riesgo conocido [225]. Se han propuesto diferentes teorías para explicar la aparición espontánea de estas, siendo una de las más discutidas la posible zoonosis. Sin embargo, los estudios epidemiológicos [250-252] evidencian que las EET esporádicas no se relacionan con

una mayor presencia de EET en animales, descartando el origen exógeno. Para comprobar esta última afirmación, se han realizado diferentes experimentos para determinar la transmisibilidad de los agentes causales del *scrapie* y el CWD en modelos murinos humanizados y/o primates no humanos. Aunque se ha demostrado que estos patógenos pueden transmitirse en ciertas circunstancias y modelos, existe un fuerte efecto de barrera de especie [253, 254] que sugiere la ausencia de relación directa entre los casos de EET en animales y las enfermedades esporádicas humanas. Por lo tanto, la hipótesis más aceptada es que estas enfermedades aparecen como resultado de una conversión espontánea de la PrP<sup>C</sup> a la PrP<sup>Sc</sup>, un fenómeno que tendría una frecuencia extremadamente baja [225].

#### 4 Modelos utilizados en el estudio de las EET

El desarrollo de sistemas capaces de mimetizar *in vitro* el proceso de propagación y conversión que tiene lugar en animales y humanos afectados por enfermedades priónicas es uno de los mayores logros y avances en el campo de los priones. Para estudiar los mecanismos de conversión de los priones se han desarrollado distintos sistemas y técnicas *in vitro* que buscan imitar los procesos moleculares de la infección por priones, pero con una reducción considerable de costes y tiempos con respecto a los experimentos realizados con modelos animales. Sin embargo, los estudios *in vivo* realizados con modelos animales transgénicos siguen siendo ampliamente utilizados para corroborar los datos obtenidos con los diferentes sistemas *in vitro* y, además, son esenciales para estudiar ciertos procesos que ocurren durante el desarrollo de la infección como la propagación de la proteína a través del SNC, la neurohistopatología que presentan las diferentes enfermedades, así como para evaluar la eficacia de fármacos y terapias frente a las EET, siendo los únicos que permiten evaluar las propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas, así como los problemas asociados a la toxicidad o los derivados del uso de distintas vías de administración.

Por ello, en este apartado se describirán los modelos más utilizados en el campo de los priones, resaltando aquellos que resultan de gran utilidad en el estudio de las estrategias terapéuticas frente a las enfermedades priónicas, y centrándose en las técnicas *in vitro* e *in vivo* utilizadas a lo largo de esta tesis.

##### 4.1 Modelos *in vitro* de propagación de priones

El primer sistema de propagación de priones *in vitro* fue desarrollado por Byron Caughey y colaboradores y se denominó ensayo de conversión libre de células [50]. El desarrollo de este sistema de propagación ha permitido identificar diferentes factores que afectan tanto al proceso de propagación como al fenómeno de barrera de transmisión [255]. Este sistema demostró por primera vez, la capacidad de la PrP<sup>Sc</sup> para transformar la PrP<sup>C</sup> en una isoforma aberrante sin la necesidad de la interacción de ningún otro componente, respaldando la teoría de “solo proteína”. Sin embargo, el bajo rendimiento del proceso de conversión y el exceso de PrP<sup>Sc</sup> necesario para iniciar la propagación, ha dificultado mucho la caracterización de la proteína malplegada generada *in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de mejorar el rendimiento del ensayo anterior [50], en el año 2000 se realizó el primer experimento de conversión *in vitro* de PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup> de forma cíclica [51]. Este estudio supuso el inicio de la técnica llamada amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA, del inglés *protein misfolding cyclic amplification*). Para el desarrollo de esta técnica fueron claves dos elementos: i) la demostración de que la capacidad de propagación se podía reproducir en un tubo de ensayo [50] y ii) un sistema cíclico basado en un baño de ultrasonidos/incubación que facilitaba el proceso [51]. Conceptualmente, la PMCA es análoga a la PCR (del inglés *polymerase chain reaction*) donde a partir de un molde se genera un número exponencial de copias en una reacción cíclica. Posteriormente, el sistema de PMCA fue automatizado con el objetivo de aumentar la sensibilidad, especificidad y rendimiento del proceso [53, 256-258]. La técnica se fundamenta en un proceso cíclico compuesto por dos fases. Durante la primera fase, la muestra que contiene cantidades mínimas de PrP<sup>Sc</sup> y que actúa como molde o semilla, se incuba en presencia de un gran exceso de PrP<sup>C</sup>, el sustrato de la reacción, induciendo la formación de agregados de PrP<sup>Sc</sup>. Después de la fase de incubación, la muestra se somete a la acción de ultrasonidos a través de la sonicación lo que se cree que aumenta el número de núcleos de crecimiento para la siguiente fase de incubación. La utilización de ciclos sucesivos permite el aumento exponencial de semillas de PrP<sup>Sc</sup> que aceleran el proceso de conversión [256]. De este modo, tras varios ciclos de incubación-sonicación, el número de moléculas de PrP<sup>Sc</sup> que eran indetectables a través de técnicas bioquímicas como el *Western blot*, se incrementan hasta niveles fácilmente detectables.

La técnica de PMCA ha sido modificada y adaptada varias veces, con la incorporación de distintos componentes, sofisticación de equipos y nuevas aplicaciones como elementos imprescindibles para su actualización. A pesar de ello, el proceso molecular que tiene lugar en la replicación *in vitro* se desconoce todavía. Se ha sugerido que la primera fase de incubación, donde ocurre la nucleación inicial, podría ser el evento más relevante para conseguir un buen nivel de amplificación. La nucleación es un proceso delicado que puede ser inhibido o alterado por distintos factores fisicoquímicos, por ejemplo: semilla y sustratos no homólogos, temperatura, concentración de PrP o inhibidores de nucleación o propagación presentes en diferentes fluidos biológicos o tejidos, entre otros.

La PMCA ha demostrado mimetizar muchos de los aspectos fundamentales de la replicación priónica que ocurren *in vivo*. Entre ellos, permite la propagación *in vitro* de diferentes cepas de priones manteniendo sus características intrínsecas de cepa [154], y reproduce el fenómeno de barrera de transmisión [259]. La técnica de PMCA nació con el objetivo de mejorar el diagnóstico de las EET a partir de diferentes muestras de tejidos o fluidos corporales donde las cantidades de PrP<sup>Sc</sup> eran indetectables por técnicas bioquímicas estándar. A modo de ejemplo, esta técnica se utilizó para detectar por primera vez priones en sangre de animales tanto sintomáticos como presintomáticos [52, 260], un procedimiento que se ha aplicado a lo largo de esta tesis para la detección de priones no sólo en tejido encefálico, sino también en tejido linforeticular.

Por otro lado, la técnica de PMCA ha sido de gran utilidad en la confirmación de la hipótesis de “solo proteína”, especialmente cuando la técnica se utilizó para la generación de priones infecciosos utilizando sustratos basados exclusivamente en PrP recombinante (recPrP), sin la necesidad de ningún cofactor sintético o procedente de mamífero [261].

Otro avance importante lo realizó el grupo liderado por Jiyan Ma cuando demostró que era posible generar priones recombinantes infecciosos *in vitro* de manera espontánea, es decir, sin la necesidad de ninguna semilla de PrP<sup>Sc</sup>. Para ello, utilizó un sustrato formado por recPrP complementado con ARN y lípidos como cofactores. El prion recombinante que se obtuvo de este experimento fue infeccioso *in vivo* en animales de genotipo salvaje [262], incluso tras su inoculación por vía intraperitoneal [263]. Posteriormente, nuevos estudios han confirmado la reproducibilidad en la generación de priones sintéticos con alta capacidad infecciosa. Los más relevantes son los realizados por el grupo de Surchai Suppattapone y colaboradores utilizando fosfatidiletanolamina como cofactor [264] o los generados por el grupo de Joaquín Castilla utilizando diferentes cofactores [63].

Aprovechándose de su versatilidad, la técnica de PMCA ha sido también empleada para el cribado de nuevos compuestos antiprionicos, aprovechando su capacidad para mimetizar los procesos implicados en la propagación priónica que ocurren *in vivo*. Por ello, a priori se podría asumir que, si un compuesto es capaz de inhibir el malplegamiento en PMCA, este podría tener también un efecto *in vivo*. Un ejemplo de esto, son el compuesto anle138b [265] y el tetrapirrol TMPyP-Fe(III) [266] que han demostrado poseer una actividad inhibitoria en PMCA, y cuya inhibición *in vitro* también se ha confirmado. Sin embargo, ninguno de estos compuestos ha podido pasar a fase clínica al detectarse problemas de otra índole como una elevada toxicidad o una muy baja eficacia debido a problemas asociados a sus farmacodinámicas y sus farmacocinéticas [267, 268].

Otro de los métodos *in vitro* de malplegamiento de proteínas más utilizados es el denominado RT-QuIC (del inglés, *real-time quacking induced conversion*). Esta técnica se basa en la agitación como fuente de energía, y en el uso de un sustrato preparado exclusivamente con PrP recombinante, tioflavina T (ThT, del inglés *thioflavine T*), sales y detergentes [269]. La ThT permite monitorizar la formación de fibras amiloides a tiempo real [270] mediante el uso de un lector de fluorescencia que posibilita la automatización de la técnica. Por ello, esta técnica es rápida, sensible y reproducible, y se ha utilizado para testar librerías de compuestos con actividad inhibitoria [271] y, sobre todo, para el diagnóstico clínico de EET utilizando diferentes tipos de muestras y tejidos provenientes tanto de humanos como de animales [272-274]. En el caso de las EET humanas ha demostrado una sensibilidad del 96% y una especificidad del 100% utilizando muestras de líquido cefalorraquídeo y raspados nasales de pacientes con sCJD [273]. Sin embargo, su principal desventaja frente a la PMCA es que las fibras amiloides producidas no son infecciosas, no pudiendo ser considerados priones *bona fide* (que recapitulan todas las características de los priones propagados en el encéfalo) y, por lo tanto, su uso es limitado para estudios de infectividad, estructurales o para el testado de compuestos.

Si bien tanto la PMCA como el RT-QuIC son técnicas ampliamente utilizadas y consolidadas, ambas presentan ciertas limitaciones. Por ello, con el objetivo de unir las ventajas de ambos sistemas, se ha desarrollado recientemente una nueva técnica de propagación *in vitro* llamada PMSA (del inglés, *protein misfolding shaking amplification*). Este método de propagación principalmente basado en la PMCA sustituye la sonicación por la agitación como fuente de energía y complementa el sustrato de PrP recombinante con dextrano sulfatado como cofactor, sales y detergente. Sin embargo, a diferencia del RT-QuIC, la PMSA permite obtener priones *bona fide* de manera reproducible, sencilla y fácilmente escalable. Los priones obtenidos a través de esta técnica presentan unas tasas de ataque del 100%, provocan signos clínicos clásicos de las enfermedades priónicas con cambios espongiiformes y acumulación de PrP malplegada en el SNC cuando son inoculados en modelos animales de genotipo salvaje [65]. Por ello, ya se está trabajando en su adaptación para el cribado masivo de compuestos con potencial actividad antipriónica [275, 276].

### 4.2 Modelos *in vivo* de propagación de priones

A pesar de que los ensayos de propagación *in vitro* de proteínas malplegadas o los sistemas de cultivos de células infectadas con priones han contribuido al conocimiento de las enfermedades priónicas, existen muchos aspectos de las EET que solamente pueden ser estudiados con detalle en modelos animales.

En los primeros estudios enfocados a conocer la capacidad de transmisión de las EET se emplearon chimpancés u ovejas como modelos naturales. Más adelante, se utilizaron roedores que facilitaron el estudio de las enfermedades priónicas, aunque solamente permitían el estudio de priones adaptables a estos roedores [16]. Décadas después y, gracias al desarrollo de modelos murinos transgénicos, se generó una amplia variedad de modelos transgénicos que expresaban la PrP<sup>C</sup> de diferentes especies animales o con diversas mutaciones, que han permitido abordar cuestiones como la función biológica de la PrP<sup>C</sup>, las barreras de transmisión o las características bioquímicas e histopatológicas de distintas cepas, además de servir como modelos para evaluar las distintas estrategias terapéuticas desarrolladas a lo largo de los años.

#### 4.2.1 Modelos murinos de fenotipo silvestre

Una de las cepas de ratones más utilizadas en los estudios de transmisión de enfermedades priónicas es la cepa C57BL/6, ratones de genotipo silvestre ampliamente utilizados en investigación biomédica debido a que presentan un fondo genético idéntico y estable. Esto permite que su fenotipo sea uniforme entre los individuos de la misma cepa. El uso de estos animales con el fin de caracterizar la infectividad de priones provenientes de diferentes especies animales presenta ciertas limitaciones debido a su baja susceptibilidad a determinadas cepas priónicas y a los largos períodos de incubación como resultado del fenómeno de barrera de transmisión [41]. Por ello, se utilizan habitualmente como receptores de cepas priónicas adaptadas mediante inoculaciones sucesivas a modelos murinos.

#### 4.2.2 Modelos murinos transgénicos

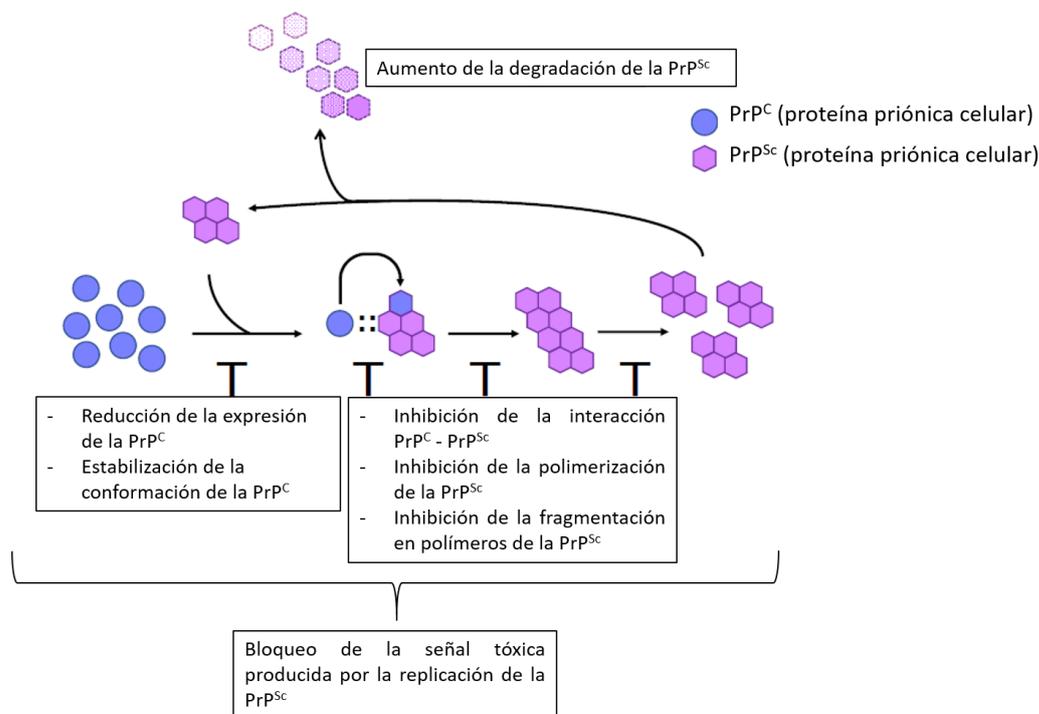
La generación de distintas líneas de ratones *PRNP-knock out* ( $PRNP^{-/-}$ ) en la década de los 90, gracias al uso de técnicas de recombinación homóloga y de clonación del cDNA [277], ha permitido profundizar en los estudios relacionados con la función de la PrP<sup>C</sup>. Experimentos clave realizados en estos modelos mostraron como la PrP<sup>C</sup> no era esencial para la supervivencia ni el correcto desarrollo del animal [278, 279] y su ausencia confería a los ratones una resistencia completa a la infección por priones [42]. Estos modelos  $PRNP^{-/-}$  han permitido generar líneas de ratones transgénicos que expresan PrP<sup>C</sup> de distintas especies, con polimorfismos de muy baja frecuencia o, incluso PrP<sup>C</sup> con mutaciones inexistentes en la naturaleza diseñados para el estudio del papel de determinados aminoácidos o regiones de la proteína y de elementos como el GPI y las glicosilaciones. Así, hoy en día se cuenta con una amplia variedad de líneas transgénicas que expresan distintos niveles de PrP<sup>C</sup> de muchas especies diferentes y con una diversidad de mutaciones en el gen *PRNP*; todo ello sin la interferencia de la PrP<sup>C</sup> endógena [280, 281]. Entre estos modelos, algunos han permitido esclarecer la relevancia de la secuencia de PrP en la barrera de transmisión o determinar que los períodos de incubación y la progresión de la enfermedad es inversamente proporcional a la cantidad de PrP expresada en los ratones [44].

Uno de los modelos transgénicos que está teniendo una gran relevancia en el campo de los priones es aquel que expresa la PrP del topillo rojo (*Myodes glareolus*) (en inglés, *Bank Vole*) y que se denomina de forma genérica como TgVole (del inglés, *transgenic Vole*). El topillo rojo es un roedor que muestra una alta susceptibilidad a la infección por priones de distintas especies llegándose a denominar receptor universal de priones [282, 283]. La PrP de este animal presenta un polimorfismo en el aminoácido 109, que puede ser metionina o isoleucina. Además, los individuos que sobreexpresan la PrP I109 muestran una predisposición a desarrollar una enfermedad priónica de forma espontánea y presentan tiempos de incubación extremadamente cortos tras ser inoculados con priones de diversas especies [49, 284]. Ambas características convierten al topillo rojo en un modelo animal de gran relevancia para estudios tanto de transmisibilidad como para comprender las enfermedades priónicas esporádicas. Sin embargo, el topillo rojo es un roedor que vive en estado salvaje y, por tanto, más difícil de obtener y mantener en condiciones de cautividad que las cepas de ratones que se han adaptado durante décadas al trabajo de laboratorio. Por ello, se han desarrollado varias líneas de ratón transgénico que expresan distintas cantidades de la PrP 109I del topillo rojo (TgVole). El TgVole es capaz de reproducir en gran parte aquellas características de mayor interés que presenta el topillo rojo [49, 285], lo que le convierte en un modelo muy útil para estudios enfocados en evaluar compuestos con actividad antipriónica, así como aquellos que tratan de abordar estrategias terapéuticas frente a las enfermedades priónicas esporádicas.

## 5 Estrategias terapéuticas

Las enfermedades priónicas son patologías neurodegenerativas cuyo desenlace es invariablemente fatal. A pesar de los conocimientos que se poseen sobre el agente causal, en la actualidad no existe ninguna terapia efectiva frente a las EET, existiendo únicamente tratamientos para paliar alguno de sus síntomas. Los tratamientos que se han ido explorando y testando desde el descubrimiento de las EET hasta la actualidad han sido muy diversos. Inicialmente, antes de la confirmación de la hipótesis de “solo proteína”, se creía que las EET estaban causadas por un virus lento, por ello los fármacos que se analizaron formaban parte del grupo de los antivirales. Durante la década de los setenta y ochenta se probaron el aciclovir [286], amantadina [287], interferón [288] y vidarabina [289], resultando todos ineficaces. A partir de la demostración de la naturaleza proteica del agente causal, el tratamiento con antivirales se abandonó para enfocarse en el tratamiento de las manifestaciones clínicas. Con este objetivo los fármacos que destacan son los analgésicos como el flupirtina [290] y los anticonvulsivos como el levetiracetam [291].

A partir de la completa aceptación de la teoría de “solo proteína” y tras el avance en el conocimiento de los procesos de propagación, diseminación, neurotoxicidad y estructura de la PrP, se han ido diseñando nuevas estrategias terapéuticas que actúan en diferentes partes del proceso patológico (figura 6). Aquí se han agrupado en: estrategias basadas en inmunoterapia, estrategias basadas en la disminución de la PrP<sup>C</sup>, estrategias basadas en la eliminación de la PrP<sup>Sc</sup> y estrategias basadas en la inhibición del malplegamiento de la proteína priónica.



**Figura 6. Representación esquemática de las principales estrategias terapéuticas frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles y sus dianas de acción. (Adaptado de Vorberg y Chiesa 2019).**

### 5.1 Estrategias basadas en inmunoterapia

El papel del sistema inmunitario en las EET parece ser poco relevante. Esto se debe a la existencia de tolerancia, como consecuencia de que la secuencia aminoacídica de la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup> es idéntica y, por tanto, el organismo no desencadena una respuesta inmunitaria robusta contra la isoforma patogénica. Además, la propagación del agente infeccioso y sus efectos nocivos tienen lugar en su mayoría en el SNC, cuya protección por la barrera hematoencefálica dificulta el desarrollo de una respuesta inmunitaria eficaz que controle la diseminación de la enfermedad. Sin embargo, sí que se observa un aumento de la actividad de la microglía en el desarrollo de las EET, la cual actúa de forma similar a los macrófagos y desempeña un papel fundamental en la defensa y mantenimiento del SNC [202]. Por esta razón, se ha propuesto la inmunización como una de las aproximaciones para tratar de controlar la neurodegeneración que tiene lugar en las enfermedades priónicas. Esta estrategia ha sido positiva en otras patologías neurodegenerativas donde existe un proceso de malplegamiento proteico [292]. El método más eficaz podría ser la inmunización activa, la cual consiste en estimular el sistema inmunitario mediante vacunas contra la PrP<sup>Sc</sup> generando anticuerpos que inicien una respuesta inmunitaria duradera. Debido a la tolerancia, el objetivo de la inmunoterapia activa sería que el sistema inmunitario reconociera la PrP<sup>Sc</sup> como un agente externo y desarrollara la respuesta inmunitaria pertinente, sin reconocer también como tal la PrP<sup>C</sup>. Existen estudios que demuestran que la inmunización de ratones a través de proteína priónica recombinante resulta en un retraso en la aparición de los signos característicos de la enfermedad [293]. Aunque se desconoce el mecanismo de acción de este tipo de vacunas, se cree que la producción de anticuerpos actuaría estabilizando la PrP<sup>C</sup> evitando su malplegamiento o bien bloqueando la interacción entre la PrP<sup>C</sup> y la PrP<sup>Sc</sup>. Otra aproximación ha sido la generación de vacunas basadas en la estructura de la PrP<sup>Sc</sup>, esquivando de este modo la tolerancia y problemas asociados a respuestas autoinmunes contra la PrP<sup>C</sup> [294, 295].

La inmunización pasiva se basa en la administración de distintos anticuerpos capaces de unirse a determinadas zonas de la PrP<sup>C</sup>, estabilizándola o impidiendo su interacción con la PrP<sup>Sc</sup> y evitando así la conversión. La habilidad de los distintos anticuerpos para inhibir la conversión de la PrP<sup>C</sup> ha sido extensamente estudiada mediante sistemas *in vitro* [296, 297]. Respecto a los experimentos *in vivo*, mencionar los anticuerpos ICSM 18 y ICSM 35, ya que ambos consiguieron retrasar la enfermedad significativamente, aunque este retraso ocurrió solamente cuando tanto el anticuerpo como el agente infeccioso se inocularon de forma intraperitoneal, evidenciando la imposibilidad de estos anticuerpos de cruzar la barrera hematoencefálica [298]. Destacar el desarrollo del anticuerpo PRN100, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-PrP<sup>C</sup> ICSM 18, que ha demostrado eficacia en ratones [298] y que actualmente está siendo administrado con carácter compasivo a pacientes afectados de CJD [299].

Aunque los estudios de inmunoterapia han avanzado significativamente, la dificultad de los anticuerpos para cruzar la barrera hematoencefálica [300] y la posible neurotoxicidad asociada a los anticuerpos anti-PrP que se unen al dominio globular y en ocasiones inician una neurotoxicidad similar a la asociada a las

EET [301-303], evidencia que aún se requieren más estudios con el fin de obtener una inmunoterapia eficaz y segura.

### 5.2 Estrategias basadas en la disminución de la PrP<sup>C</sup>

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la PrP<sup>C</sup> puede ser una diana terapéutica capaz de intervenir en la progresión de la enfermedad. En la década de los 90, los modelos murinos *knock-out* para la PrP<sup>C</sup> mostraron una clara resistencia a la infección por priones [304]. Años más tarde el grupo de Giovanna Mallucci demostró que la eliminación de la PrP<sup>C</sup> revertía la espongiosis una vez iniciada la infección por priones [94]. Una de las conclusiones que se extrajeron de estos estudios, fue que la presencia de PrP<sup>C</sup> era una condición imprescindible para que se diera la enfermedad y que su disminución o eliminación evitaría la aparición de la enfermedad. Sin embargo, también se evidenciaría que la ausencia total de PrP<sup>C</sup> en modelos murinos provoca diferentes deficiencias en ciertas funciones que se han vinculado a la PrP<sup>C</sup> [108]. Por tanto, aunque la eliminación completa de la PrP<sup>C</sup> podría no ser recomendable por su potencial papel en el correcto funcionamiento neuronal, una aproximación que parece adecuada consistiría en la reducción en la expresión de la PrP<sup>C</sup>.

Se han testado diferentes estrategias para reducir los niveles de PrP<sup>C</sup>, siendo una de ellas la utilización de compuestos químicos que reducen la expresión de PrP<sup>C</sup> [186] o cambian su localización celular para evitar la interacción PrP<sup>C</sup> - PrP<sup>Sc</sup> [305]. En la misma dirección se ha desarrollado con resultados muy prometedores una nueva estrategia basada en la utilización de nucleótidos antisentido (ASO, del inglés *antisense nucleotides*). Los ASO son oligonucleótidos de cadena única capaces de unirse a una cadena de RNA cuya secuencia sea complementaria y de este modo modular la traducción [306]. Estos ASO han sido utilizados en otras enfermedades neurodegenerativas, estando algunos ya en fases clínicas [307, 308] [309]. La utilización de estas moléculas con el fin de retrasar el curso de una EET ha demostrado un aumento de la supervivencia en modelos murinos infectados con priones. Estudios recientes han demostrado que su eficacia contra las enfermedades priónicas está causada por la reducción de los niveles de PrP<sup>C</sup> y no por una interacción aptamérica entre los ASO y la PrP que evite la interacción PrP<sup>C</sup> - PrP<sup>Sc</sup> [310]. Desafortunadamente, se ha observado cierta toxicidad asociada a la administración de estos ASO durante un ensayo clínico [311], observándose trombocitopenia en algunos pacientes [312]. Por esta razón, son necesarios más ensayos de toxicidad y efectividad que demuestren que el uso de los ASO es eficaz y seguro en humanos afectados de una EET.

### 5.3 Estrategias basadas en la eliminación de la PrP<sup>Sc</sup>

La identificación de la PrP<sup>Sc</sup> como agente causal de las EET, convierte a esta molécula en la diana ideal de diferentes acciones terapéuticas. Por ello, se han diseñado una diversidad de estrategias cuyo objetivo es el de disminuir la PrP<sup>Sc</sup>. Una de estas estrategias ha consistido en la administración de compuestos capaces de unirse a los agregados u oligómeros de PrP<sup>Sc</sup> para evitar su propagación y reducir los niveles de estos. Entre estos compuestos se encuentra el rojo Congo (del inglés, Congo red), un fluoróforo que tiene afinidad por las estructuras amiloides y que inhibe la propagación priónica [313, 314]. Otra aproximación

consiste en incrementar la eliminación de los agregados proteicos utilizando mecanismos existentes en la célula, como la inducción del aumento de la respuesta UPS. Se ha observado en células infectadas con priones, que la activación del complejo UPS a través de una molécula llamada IU1 induce la eliminación de PrP<sup>Sc</sup> [193]. Por otra parte, existen diferentes estudios en los que se han utilizado fármacos que inducían el proceso de autofagia, reduciendo la neurodegeneración en diferentes modelos de la enfermedad [184-186]. Uno de los ejemplos más relevantes es el de la rapamicina, que actúa inhibiendo mTOR y consecuentemente induce de forma significativa la autofagia [315]. Sin embargo, este tipo de estrategias, en las que se actúa sobre una diana cuya regulación es compleja, aunque muestren cierta eficacia no son recomendables, ya que intervienen en múltiples cascadas de señalización provocando con frecuencia efectos no deseados [316].

Finalmente, cabe mencionar los fármacos que actúan sobre la UPR, cuya función principal es actuar sobre la cascada de señalización de este mecanismo de homeostasis celular, controlando así la síntesis de chaperonas y otras proteínas que ayudan a corregir plegamientos incorrectos en el RE. Estos compuestos evitarían la respuesta exacerbada de la UPR que ocurre durante la infección por priones y, por consiguiente, el daño neuronal asociado al mismo. Como regulador de la UPR, está el compuesto GSK2606414, que actúa inhibiendo la quinasa PERK y previene la neurodegeneración, aumentando el tiempo de supervivencia en modelos murinos [200] o un compuesto llamado ISRIB que actúa inhibiendo de forma parcial ISR (del inglés *integrated stress response*) [317]. La principal desventaja de estos fármacos es que poseen una toxicidad muy alta, dado que interfieren en mecanismos de control celular derivando en efectos no deseados [199].

#### **5.4 Estrategias dirigidas a evitar la conversión de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>**

En la actualidad las estrategias cuyo objetivo es inhibir el proceso de malplegamiento son las que han sido más estudiadas y mejores resultados han conseguido, llegando algunas a evaluarse a través de ensayos clínicos en pacientes. Existen diferentes maneras de evitar la conversión de la PrP<sup>C</sup> en PrP<sup>Sc</sup>: 1) compuestos que actúan como chaperonas estabilizando la PrP<sup>C</sup>, 2) moléculas que se unen a la PrP<sup>C</sup> evitando su interacción con la PrP<sup>Sc</sup> y 3) compuestos que se unen a la PrP<sup>Sc</sup> evitando la elongación y/o rotura de las fibras. En la mayoría de los casos, aunque los compuestos estudiados (muchos de ellos encontrados a través del cribado de moléculas) muestren una patente inhibición de la conversión, se desconoce cuáles son los mecanismos de acción por los cuales actúan para conseguir una reducción de la propagación priónica. El conocimiento a nivel molecular acumulado a lo largo de esta última década sobre los principales componentes de la propagación priónica está permitiendo diseñar novedosas aproximaciones terapéuticas. En este apartado se describirán aquellos compuestos que han alcanzado fases preclínicas y/o clínicas y cuyos resultados han sido más prometedores.

Entre los compuestos que inhiben el malplegamiento proteico y que han sido testados en pacientes afectados de una enfermedad priónica están: la quinacrina, el pentosan polisulfato, y la doxiciclina [318]. La quinacrina es un agente lisosomotrópico que resultó ser muy eficaz inhibiendo la propagación de

distintas cepas de priones en cultivos celulares infectados [319, 320], pero no en modelos animales [321] [322]. Sin embargo, cuando se evaluó en ensayos clínicos tanto en el Reino Unido [323] como en Estados Unidos [324], no se observaron diferencias en la supervivencia de los grupos de pacientes tratados y no tratados [323, 324]. Otro compuesto extensamente estudiado es el pentosan polisulfato (PPS, del inglés *pentosan polysulfate*). Se trata de un polisacárido semisintético que fue descubierto por primera vez por Farquhar y Dickinson en 1986, cuando inyectaron PPS por vía intraperitoneal a ratones infectados con *scrapie* y descubrieron una inhibición de la propagación de priones en el sistema linforeticular y un aumento en la supervivencia [325]. A pesar de su buen funcionamiento inhibiendo la replicación periférica, el PPS presenta un alto número de cargas negativas que no le permiten traspasar la barrera hematoencefálica. Esto obligó a utilizar la vía intraventricular como alternativa para la administración del compuesto directamente al encéfalo. A través de esta vía de administración, el PPS inhibió la acumulación de PrP<sup>Sc</sup>, redujo la neurodegeneración y aumentó la supervivencia en ratones transgénicos infectados [326]. Con este resultado tan prometedor, se realizó un ensayo clínico con 11 pacientes, con un resultado negativo dado que no hubo ninguna mejora en los signos clínicos ni en la supervivencia de los sujetos sometidos a estudio [327]. Por último, la doxiciclina, un antibiótico del grupo de las tetraciclinas, que ha mostrado una significativa capacidad para inhibir la propagación priónica *in vivo* e *in vitro* [328]. Siguiendo estos estudios, se realizó un ensayo en 121 pacientes con distintos CJD, aunque no se encontraron diferencias entre los grupos control y tratado [329]. Sin embargo, el grupo liderado por Inga Zerr en 2016 realizó un ensayo clínico doble ciego de fase II con 12 individuos, así como un ensayo clínico observacional con 55 pacientes en una etapa temprana de sCJD y 33 controles, observándose en ambos ensayos un ligero aumento, aunque significativo, de la supervivencia [330]. Por otro lado, la doxiciclina está siendo administrada de forma continuada en un ensayo clínico observacional a un grupo de individuos que poseen la mutación D178N/129M, que da lugar a FFI, de forma preventiva. Este ensayo tiene una duración de 10 años y se lleva realizando desde el 2010 y finalizará en el año 2021 [331], cuando se evaluará si realmente a la doxiciclina ha reducido la incidencia de la enfermedad en los portadores de la mutación.

Existen otros compuestos que han mostrado una actividad inhibitoria significativa tanto *in vitro* como *in vivo*, y aunque no se han realizado aún ensayos clínicos con ellos, merece la pena destacarlos debido a su potencialidad como futuros fármacos. Entre ellos destacan el compB, las antraciclinas y los tetrapirroles. El compB [4-(oxazol-5-yl) phenyl]-2-((pyridin-4-yl) methylene)hydrazine] presenta el inconveniente de que su eficacia es dependiente del tipo de cepa priónica y, además, su degradación puede generar un metabolito tóxico [332]. Las antraciclinas son compuestos utilizados en quimioterapia que han demostrado *in vivo* también un efecto antipriónico reduciendo los depósitos amiloides presentes en el encéfalo. Su mayor inconveniente es que poseen una alta toxicidad [333, 334]. Los tetrapirroles son compuestos formados por un anillo tetrapirrólico, donde cada anillo pirrólico está unido mediante puentes metinos, pudiendo contener un átomo metálico en el centro [335]. Entre los distintos tetrapirroles que están descritos, hay un grupo de compuestos que destacan por ser metabolitos naturales y se denominan porfirinas.

#### 5.4.1 Porfirinas

Las porfirinas son compuestos cíclicos que poseen 4 anillos pirrólicos enlazados por puentes metina (=HC-). Las porfirinas que se producen de manera natural presentan una diversidad de cadenas laterales que reemplazan los ocho átomos de hidrógeno de los pirroles. Además, algunas poseen la propiedad de formar complejos con iones metálicos unidos al átomo de nitrógeno de los anillos de pirrol [336]. Estos compuestos, aunque muestran cierta toxicidad cuando se presentan en una alta concentración, son bien toleradas por el organismo [337].

Se cree que estos compuestos actúan como chaperonas moleculares estabilizando la estructura de la PrP<sup>C</sup> y evitando su malplegamiento. Diferentes estudios *in vivo*, *in vitro* e *in cellula* han corroborado el potente efecto inhibitorio de estas moléculas [266, 338, 339]. Una de las porfirinas más conocidas es el TMPyP-Fe(III) (del inglés, *Iron (III) meso-Tetra (N-methyl-4-pyridyl) porphine*), y ha demostrado la capacidad de unirse a la PrP<sup>C</sup> en una ratio 1:1 con una constante de disociación (Kd) de pocos micromoles [266, 340]. Además, el TMPyP-Fe(III) ha sido utilizado como compuesto terapéutico frente a otras enfermedades neurodegenerativas evitando la agregación de las distintas proteínas responsables; evitando la oligomerización de la  $\alpha$ -sinucleína [341] o la agregación del amiloide A $\beta$  [267]. Además, el hecho de que sea un compuesto fototóxico ha permitido utilizarse también como terapia antitumoral [342, 343]. En relación con el estudio de los priones, el TMPyP-Fe(III) fue descrito por su acción antiprionica por primera vez por el grupo de Byron Caughey en 1998, que testaron su actividad inhibitoria, tanto en células infectadas con *scrapie* (ScNB) como en un sistema de propagación de priones *in vitro* basada en PrP de hámster, con resultados discretos [338]. A partir de este primer estudio, se han ido desarrollando diversos experimentos evaluando la actividad inhibitoria de este compuesto. La actividad antiprionica *in vivo* se testó en ratones transgénicos que expresaban la PrP de hámster infectados de forma intraperitoneal mostrando un aumento significativo de la supervivencia cuando el TMPyP-Fe(III) se administraba de forma intraperitoneal el mismo día de la infección y no cuando se trataba de forma posterior [339]. También se ha observado un efecto inhibitorio en células infectadas con diferentes cepas murinas [266]. No obstante, los modestos resultados obtenidos y errores en el diseño experimental hicieron, entre otros, que se abandonase por el momento esta estrategia terapéutica.

Sin embargo, dada su similitud con TMPyP-Fe(III) y el hecho de que sean metabolitos naturales, hace que las porfirinas sigan considerándose una buena alternativa terapéutica frente a las EET. Dentro del amplio grupo de las porfirinas destaca la uroporfirina I (URO I), un metabolito intermediario de la ruta de biosíntesis del grupo hemo cuya acumulación en el organismo genera una patología llamada porfiria (ver apartado a continuación) [344]. La uroporfirina I es un isómero de la uroporfirina III, y se considera la molécula con mayor capacidad de inhibición de la

conversión de PrP<sup>C</sup> a PrP<sup>Sc</sup> detectado hasta la fecha, razón por la que su actividad antipriónica es el objeto de investigación de esta tesis.

## 6 Porfirias

Las porfirias son un grupo de enfermedades metabólicas causadas por un error o una función anormal en alguna de las enzimas que participan en la ruta biosintética del grupo hemo y que se caracterizan por una acumulación excesiva de porfirinas y/o sus precursores [345]. En esta ruta metabólica participan ocho enzimas que, desde el inicio de la ruta biosintética, que parte de la glicina y el succinil-CoA, catalizan la formación del grupo hemo, que es el metabolito final [337]. Existen diversos síndromes que se engloban bajo el término de porfiria, cuyas diferencias dependen de la enzima afectada en la ruta biosintética del grupo hemo, lo que lleva a la acumulación de distintos metabolitos secundarios. Tradicionalmente las porfirias se han clasificado en hepáticas o eritropoyéticas según el lugar principal de la acumulación y sobreproducción de estas porfirinas o sus precursores, aunque en algunos casos quedan superpuestas. Las hepáticas se caracterizan por una sobreproducción y acumulación inicial principalmente en el hígado mientras que en las eritropoyéticas este hecho ocurre principalmente en las células eritroides de la médula ósea [346]. Dentro de este último grupo está la porfiria eritropoyética congénita (CEP, del inglés *congenital erythropoietic porphyria*) que es una de las porfirias menos comunes y está incluida dentro de las porfirias crónicas. La CEP es una patología hereditaria causada por una actividad deficiente de la enzima citosólica uroporfirinógeno III sintasa (UROIII) [344]. Esta UROIII es la cuarta enzima de la ruta biosintética del grupo hemo, la cual reordena y cicla el hidroximetilbilano lineal (HMB), para dar lugar a la forma isomérica III del uroporfirinógeno. En condiciones normales, una fracción de este HMB se escapa de la acción de la UROIII, lo cual resulta en una conversión no enzimática hacia el isómero uroporfirinógeno I [347]. El exceso de estos uroporfirinógenos se excreta por la orina en sus formas oxidadas que son la uroporfirina I y III (URO I y URO III, respectivamente [348].

En el caso de los pacientes con CEP, un defecto en la enzima UROIII reduce en gran medida la capacidad de la misma de catalizar la formación de uroporfirinógeno III, lo que lleva a la acumulación de su sustrato, el HMB, el cual de forma no enzimática se convierte en uroporfirinógeno I. Debido a que la ruta no funciona correctamente, este uroporfirinógeno se acumula en grandes cantidades, y sufre una autooxidación hacia uroporfirina I, cuya acumulación es la causa principal de la CEP [344].

La acumulación de URO I ocurre en su mayoría en el precursor eritroide de la médula ósea, donde se produce el grupo hemo necesario para la hemoglobina y, consecuentemente, para los eritrocitos. La URO I acumulada en estas células eritroides se libera al plasma por hemólisis o por difusión, y se deposita en diferentes tejidos, principalmente, en la piel y los huesos; el resto se excreta a través de la orina. También se puede encontrar un exceso de URO I en el bazo y en menor medida en el hígado [349, 350]. Los signos clínicos de los pacientes con CEP, derivados de la acumulación de UROI como consecuencia del déficit de uroporfirinógeno III y, por tanto, de los productos posteriores de la ruta biosintética del grupo hemo, varían entre pacientes, así como la edad de aparición y la severidad de estos. En la mayoría de los casos

la enfermedad aparece entre el período neonatal y los 10 años, y su fenotipo está dominado por una fotosensibilidad en la piel debido a las propiedades fototóxicas de la URO I, problemas hematológicos, anemia hemolítica, trombocitopenia y esplenomegalia debidas a la deficiencia de uroporfirinógenos III [351]. También pueden presentar otros signos clínicos como presencia de porfirinas en la orina, otorgándole un característico color rojo, problemas oculares como úlceras corneales, eritrodoncia y osteopenia, todo ello causado por el depósito de porfirinas [352]. Sin embargo, se ha observado una amplia heterogeneidad clínica y una variabilidad fenotípica entre pacientes, incluyendo entre miembros de la misma familia [351].

Aunque es una enfermedad crónica, existen varios tratamientos para evitar, en su mayoría, las lesiones cutáneas provocadas por la fototoxicidad de las porfirinas, ya que la severidad de las manifestaciones cutáneas es dependiente de los niveles de porfirina acumulados en el tejido expuesto y el grado de exposición a la luz [353]. Estos tratamientos se basan en evitar la exposición a los rayos del sol y ultravioleta, además de un meticuloso cuidado de la piel. La anemia que sufren los pacientes de CEP puede ser severa y algunos requieren de transfusiones, pudiéndose requerir incluso una esplenectomía para reducir el número de transfusiones. Recientemente se ha publicado una posible y esperanzadora terapia curativa mediante la administración de una chaperona farmacológica que recupera en gran parte la funcionalidad de la UROIIIIS [354]. Sin embargo, los trasplantes de médula son por el momento, el único tratamiento que se ha demostrado que puede curar a pacientes con CEP moderada-severa [355, 356] [337], a la espera de que se realicen los pertinentes ensayos clínicos de la chaperona farmacológica recientemente descrita.

### **6.1 Modelos animales de CEP**

Debido a que la CEP es una enfermedad rara con una prevalencia de 1 o menos personas afectadas por cada 1 000 000, el desarrollo de un modelo animal capaz de desarrollar esta enfermedad era necesario para comprenderla y estudiarla de forma sistemática. Verneuil y colaboradores desarrollaron un ratón transgénico que presenta un fenotipo típico de CEP. Este modelo animal presenta de forma homocigota la mutación P248Q en la enzima UROIIIIS (la segunda mutación causante de CEP más abundante en personas) ya que los heterocigotos presentan el mismo fenotipo que los modelos de genotipo silvestre. Su fenotipo muestra las siguientes características, todas ellas causadas por la acumulación de porfirinas, principalmente la URO I: orina de color rojo y eritrodoncia desde las primeras semanas de vida, fotosensibilidad que lleva a dermatitis en tejidos blandos (orejas, ojos, etc.), así como esplenomegalia y hepatomegalia. Además, los huesos son anormalmente más frágiles y presentan cierta coloración rojiza. Sin embargo, con los cuidados oportunos y una estabulación con una menor luminosidad diaria presentan un peso y una supervivencia equivalente al animal silvestre [357]. Este modelo ha resultado de una gran utilidad para evaluar la eficacia del URO I como compuesto antipríónico, ya que presenta de forma endógena unos niveles sistémicos de URO I en sangre de entre 60 y 200  $\mu\text{M}$  y en el cerebro de entre 1 y 2  $\mu\text{M}$ , que son concentraciones que serían complicadas de conseguir de forma exógena debido a la baja solubilidad del compuesto.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### Hipótesis

La uroporfirina I, dada su similitud estructural con otros tetrapirroles como el TMPyP-Fe(III) que previamente ha demostrado una buena actividad antipríónica, podría presentar un efecto igual o mejor que este y, por tanto, convertirse en una opción terapéutica prometedora frente a las encefalopatías espongiformes transmisibles.

### Objetivos

1. Evaluar la capacidad de la uroporfirina I para inhibir la propagación de priones *in vitro* comparativamente con la del tetrapirrol más efectivo descrito hasta la fecha, el TMPyP-Fe(III).
  - a. Determinar si la uroporfirina I presenta especificidad en cuanto a su capacidad de inhibir la propagación de priones de diferentes especies y distintas cepas.
  - b. Determinar si la uroporfirina I inhibe la propagación de priones humanos.
2. Dilucidar el posible mecanismo de acción de la uroporfirina I mediante el estudio de su unión a la PrP humana por resonancia magnética nuclear.
3. Estudiar las características farmacocinéticas de la uroporfirina I y su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica.
4. Evaluar la capacidad de la uroporfirina I para inhibir la propagación de priones *in vivo* utilizando modelos animales que presentan niveles elevados de este metabolito natural en sangre.
  - a. Determinar si la uroporfirina I inhibe la propagación de distintas cepas priónicas en modelos animales de enfermedad priónica inducida.
  - b. Determinar si la uroporfirina I inhibe la propagación de priones en modelos animales de enfermedad priónica espontánea.
5. Evaluar el trasplante de médula ósea productora de uroporfirina I como estrategia terapéutica frente a las enfermedades priónicas.
  - a. Evaluar si es posible alcanzar niveles elevados de uroporfirina I en animales de fenotipo silvestre mediante el trasplante de médula ósea de los modelos transgénicos que producen niveles elevados del compuesto.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1 Construcción de los plásmidos de expresión de las PrP recombinantes de humano

La generación de las PrP recombinantes (recPrP) de humano se realizó mediante la utilización de vectores plasmídicos para la expresión de genes eucariotas en procariontes; en este caso, los vectores pOPIN desarrollados por Oxford Protein Production Facility UK (OPPF). Estos vectores están diseñados para la clonación mediante recombinación homóloga, concretamente utilizando el método *In Fusion*, que permite una alta expresión de la proteína introducida [358]. En este caso, se utilizó el plásmido pOPIN E, el cual está basado en el vector pTriEx2 cuyas principales características son su resistencia al antibiótico ampicilina, la presencia de un *enhancer* (del inglés, potenciador) híbrido de Citomegalovirus (CMV), del promotor de  $\beta$ -actina que permite la expresión de proteínas eucariotas en bacterias *E. coli* y de una diana para la carboxipeptidasa A seguida de una cola de 6 histidinas, necesarias para la purificación de proteínas mediante el sistema de cromatografía de afinidad Níquel - Ácido Nitriloacético (Ni-NTA, del inglés *Niquel - Nitriloacetic Acid*).

El vector pOPIN E se digirió con las enzimas de restricción NcoI y PmeI (New England Laboratories) siguiendo el protocolo de la OPPF (*A Guide to using the OPPF pOPIN Vector suite for HTP In-Fusion Cloning*). Tras su digestión, los fragmentos de ADN se separaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) (Thermo Scientific) y se visualizaron mediante tinción con *RedSafe* (iNtRON Biotechnology) según las especificaciones del fabricante. Por último, el vector linealizado de 5151 pares de bases se purificó mediante el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Mediante la utilización de la técnica de PCR se adecuaron los extremos de las secuencias del gen de la PrP humana 129M y 129V para la clonación de esta secuencia en el vector pOPIN E a través del sistema *In Fusion*. Para ello, los oligonucleótidos fueron diseñados teniendo en cuenta las especificaciones señaladas en el protocolo de la OPPF. El diseño de estos oligonucleótidos es crítico para una adecuada recombinación homóloga entre los extremos de la secuencia a clonar y el vector. Por ello, los oligonucleótidos diseñados para tal fin se hicieron coincidir al menos 15 pares de bases con los extremos del vector. Además, en el oligonucleótido del extremo carboxilo terminal se introdujo un codón de terminación (TTA) en la posición de la lisina de la cola de histidinas para evitar la expresión de estas y el corte con carboxi-peptidasa A tras la purificación. El uso de esta enzima sería necesario para eliminar la cola de histidinas de la proteína purificada tal como está indicado en el protocolo del fabricante de los vectores pOPIN E. Sin embargo, la expresión de la cola de seis histidinas es innecesaria debido a la existencia de numerosas histidinas en la zona de las octarrepeticiones de la proteína del prion, que cumplen con la misma función que una cola de histidinas añadida de forma artificial para su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Las secuencias 5'-3' de los oligonucleótidos utilizados son las siguientes:

- Oligonucleótido del extremo amino terminal para la PrP de humano 129M y 129V

AGGAGATATACCATGAAGAAGCGCCCGAAGCCTGG

- Oligonucleótido del extremo carboxilo terminal para la PrP de humano 129M y 129V:

GTGATGGTGATGTTAGCTGATCCTCTCTGGTAATA

Se realizó una PCR para amplificar la secuencia de ADN de interés mediante los oligonucleótidos específicamente diseñados y mostrados anteriormente. Para ello, se utilizó como molde el ADN de la PrP de humano de los plásmidos que contenían este gen, previamente generados en el laboratorio a partir de ADN genómico. Los reactivos presentes en las reacciones de PCR fueron: 2 - 10 ng de ADN genómico, 50 ng de cada uno de los oligonucleótidos (Sigma), 1.25 unidades *LongAmp™ Taq DNA Polymerase* (New England Biolabs), 10 µl 5X *LongAmp™ Taq Reaction Buffer* (New England Biolabs), 0.4 µl dNTP 10 mM (Sigma-Aldrich), H<sub>2</sub>O desionizada (hasta alcanzar un volumen final de reacción de 50 µl). La PCR constó de, un ciclo inicial de desnaturalización del molde de ADN de partida mediante calentamiento a 95 °C durante 5 min, a continuación, 35 ciclos de amplificación y finalmente, un período adicional de 10 min a 72 °C que permite la extensión de los productos de PCR incompletos. Cada ciclo de amplificación consistió en una fase de desnaturalización a 95 °C durante 20 s, seguido de un período de 45 s a 56 °C que facilita la hibridación de los oligonucleótidos con el molde de ADN y finaliza con uno de 60 s a 72 °C que permite la polimerización de las nuevas cadenas de ADN. El producto de PCR se almacenó y conservó a 4 °C. Para realizar las PCR se empleó el termociclador *DNA Engine Peltier Thermal Cyclers, PTC-200* (Bio-Rad).

Tras comprobar que el tamaño del fragmento amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (p/v) era correcto, se continuó con el protocolo descrito por la casa comercial y el producto de PCR se digirió con la enzima de restricción DpnI (New England Biolabs) para eliminar los fragmentos de ADN metilados procedentes del molde utilizado para la reacción. Las muestras digeridas se purificaron mediante el kit *QIAquick PCR purification* (Qiagen) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Después de la linealización del vector pOPIN E y la adecuación de los extremos de los insertos que contienen el gen de las PrP humanas, se realizó la clonación de estos fragmentos en el vector mediante el método de clonación *In Fusion Dry-Down PCR Cloning Kit* (Clontech), siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Para ello, y tras determinar las concentraciones de vector e inserto mediante el equipo *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific), los reactivos se mezclaron en una ratio molar 2:1 (vector:inserto), utilizando concretamente, 150 ng de vector y 60 ng de inserto.

Para terminar, los productos de la recombinación se transformaron en bacterias ultra-competentes *Escherichia coli DH5 XL-Gold®* (Stratagene) siguiendo el protocolo estándar de transformación mediante choque térmico descrito por Inoue et al (Inoue, Nojima et al. 1990). Algunas de las colonias bacterianas obtenidas en placas con 50 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) se cultivaron en 2 ml de medio de cultivo Luria Bertoni (LB) (Pronadisa) con 50 µg/ml de ampicilina y se incubaron a 37 °C en agitación toda la noche. A partir de los cultivos, los plásmidos procedentes de colonias bacterianas se purificaron empleando el kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante. Para verificar que los

plásmidos purificados tenían incorporados los genes que codifican las PrP de humano 129M y 129V, se realizó un análisis de restricción del plásmido con la enzima de restricción Aval (New England Biolabs) siguiendo el protocolo del fabricante. Finalmente, con el fin de asegurar que los plásmidos obtenidos contenían la secuencia correcta, el gen de la PrP y los extremos adyacentes se secuenciaron completamente mediante el servicio de secuenciación de Stabvida empleando el oligonucleótido universal T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Obteniendo los siguientes plásmidos:

- pOPIN E PrP<sub>23-231</sub> humana 129M
- pOPIN E PrP<sub>23-231</sub> humana 129V

## 2 Expresión y purificación de las PrP recombinantes humanas

### 2.1 Transformación de plásmidos en bacterias *E. coli* DE3 mediante choque térmico

Con el objetivo de producir las proteínas recombinantes completas [recPrP (23-231)], a partir de los plásmidos de expresión pOPIN E descritos anteriormente, los vectores se transformaron en bacterias súper competentes *E. coli* Rosetta (DE3)<sup>™</sup> (EMD Millipore), desarrolladas para la sobreexpresión de proteínas. Los plásmidos pOPIN E se transformaron en estas bacterias mediante el protocolo estándar de transformación por choque térmico (Inoue, Nojima et al. 1990) y se conservaron posteriormente a -80°C en medio LB con glicerol a una ratio de 1:1 (v:v).

### 2.2 Expresión y purificación de proteínas recombinantes para su uso en resonancia magnética nuclear

Las bacterias *Rosetta* DE3 transformadas con los plásmidos de interés se cultivaron en 2.5 ml de medio LB (Pronadisa) en presencia de ampicilina (20 µg/ml) a 37 °C en agitación a 200 rpm durante 5 h. Posteriormente, se centrifugaron estos 2.5 ml a 3000 g durante 5 minutos para pelletear las bacterias sin dañarlas. El objetivo de esta purificación proteica es obtener suficiente recPrP nativa para analizarla mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN), por lo tanto, debe de cumplir una serie de características, como un marcaje isotópico homogéneo, superior al 97 %, por lo que se produjo en medio mínimo. El medio mínimo consta de una solución base de M9 1x

[6 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 3 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 0.5 g de NaCl (Sigma-Aldrich) por litro ajustado a pH 7] filtrado al que se le añaden 1 g/l de NH<sub>4</sub>Cl, marcado con N<sup>15</sup> (Cambridge Isotopes Laboratory), 3 g/l de glucosa (Sigma-Aldrich), 1 mM de MgSO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich), 0.1 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich), 10 mg/l de tiamina (Sigma-Aldrich) y biotina (Sigma-Aldrich). Una vez preparado puede conservarse a 4 °C 24 horas máximo.

El pellet obtenido del cultivo de 2.5 ml se resuspendió en 500 ml de medio mínimo marcado con N<sup>15</sup> a una concentración de 20 µg/ml de ampicilina (Sigma-Aldrich) y se incubó a 37 °C en agitación a 200 rpm toda la noche. Al día siguiente, se mezclaron estos 500 ml con 5 l de medio mínimo marcado con N<sup>15</sup> y se dejó a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica en la longitud de onda de 600 nm

## MATERIALES Y MÉTODOS

(DO<sub>600</sub>) de 0.6 - 0.8. Cuando se alcanzó esta densidad, para inducir la síntesis de la proteína en las bacterias cultivadas, se añadió al cultivo bacteriano Isopropil-β-D-1-tiogalactopirósido (IPTG) (Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM y se mantuvo toda la noche a 200 rpm y a 30 °C. Al día siguiente, la inducción se detuvo centrifugando a 4500 g durante 15 minutos a 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific), de este modo se precipitaron las bacterias que acumulan la proteína recombinante producida en forma de cuerpos de inclusión.

El pellet bacteriano se resuspendió en 120 ml de buffer de resuspensión [20 mM fosfato de sodio (NaX(PO<sub>4</sub>)) (Sigma-Aldrich), 1 mM ditriotretol (DTT) (Panreac), 300 mM de cloruro sódico (NaCl) (Sigma-Aldrich), 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 6.0]. El producto resuspendido se separó en fracciones de 40 ml y se enfrió con abundante hielo. Una vez enfriado, se sonicó a una amplitud del 60 % durante 6 ciclos de 30 s de sonicación y 60 s de incubación en hielo. Después de la sonicación, la muestra se centrifugó a 35 000 g (Beckman - Coulter ultracentrífuga XL - 100K) utilizando un rotor de 45 Ti (Beckman Coulter) durante 1 h a 4 °C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 60 ml de buffer de inclusión [20 mM fosfato de sodio (NaX(PO<sub>4</sub>)) (Sigma-Aldrich), 1 mM ditriotretol (DTT) (Panreac), 0.5M de cloruro sódico (NaCl) (Sigma-Aldrich), 6 M de cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) (Fisher Scientific), pH ajustado a 6.0] y a continuación se incubó toda la noche a 37 °C en agitación a 200 rpm. Al día siguiente, se centrifugó a 25 000 g con el rotor 45 Ti (Beckman Coulter) a 60 minutos a 4 °C, se recogió el sobrenadante y se sometió a sonicación 2 veces durante 15 segundos al 60 % de amplitud con un sonicador de punta acoplado a un sistema Misonix Q-700 (Qsonica). Posteriormente, se pasaron las muestras por filtros de 0.22 μm (Minisart, Sartorius Stedim) y se almacenan a -80 °C hasta su posterior purificación.

Para purificar la PrP recombinante para ser utilizada en RMN, se realizó un protocolo de purificación con plegamiento en columna. Para ello, la PrP se purificó utilizando columnas de afinidad Ni-NTA HisTrap FF Crude 5 ml (GE Healthcare Amersham) acopladas a un sistema de FPLC (ÄKTA™ start, GE Healthcare Amersham). Las columnas se equilibran con 20 ml de solución de equilibrio [20 mM NaX(PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), 300 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 6 M Gnd-HCl (Fisher Scientific), 1 mM DTT (Panreac) ajustado a pH 7.0]. Seguidamente, el extracto de cuerpos de inclusión solubilizado se cargó en la columna y se lavó mediante un gradiente que iba desde el 100 % de solución de equilibrio hasta un 100 % de solución de lavado [20 mM NaX(PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), 300 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT (Panreac) ajustado a pH 7.0]. Una vez la realizado el lavado, de aproximadamente 50 ml, la proteína plegada en columna se eluyó utilizando 165 ml de solución de elución [20 mM NaX(PO<sub>4</sub>) (Sigma-Aldrich), 300 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 1 mM DTT (Panreac) ajustado a pH 6.0]. Las proteínas purificadas mediante columnas de afinidad HisTrap se dializaron cargándose en una tripa de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa SnakeSkin Dialysis Tubing, 10K MWCO (Thermo Scientific) durante 4 h frente a acetato de sodio (AcNa, ajustado a pH 6.0) (Sigma-Aldrich) a 4 °C y con 3 cambios sucesivos de buffer de diálisis, dejando en el último cambio que la diálisis transcurriera durante toda la noche. En el proceso de diálisis se observó la formación de acúmulos

blanquecinos de proteína anormalmente plegada. Para la eliminación de este precipitado las muestras dializadas se centrifugaron a 19 000 g durante 15 min a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific). Posteriormente se concentraron hasta alcanzar, como mínimo, 75 µM o 1.875 mg/ml mediante filtros de centrifugación con un límite de exclusión de 10 kDa (Amicon Ultra-15 10 kDa Centrifugal filter unit, Millipore). Una vez dializada, la proteína se utilizó en un plazo máximo de 2 - 3 días, conservándose mientras tanto a 4 °C.

La pureza de la proteína recombinante obtenida y la eficacia del proceso de purificación se evaluaron mediante tinción de proteína total tras electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) (Criterion TGX 4 – 15 %, Bio-Rad). A lo largo del proceso de purificación se fueron recogiendo muestras de 10 µl de varios de los eluidos obtenidos. En concreto se recogieron muestras de 10 µl antes de cargar la proteína en la columna de afinidad (fracción de lisis), de la muestra filtrada tras su paso por la columna (fracción de carga) y de la proteína final purificada (fracción de elución). A continuación, se precipitaron añadiendo 56.7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19 000 g a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado se resuspendió en 16 µl de solución de carga NuPAGE (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:3 en PBS (del inglés *Phosphate Buffer Saline*) (Fisher Bioreagents) y se cargó en un gel de electroforesis desnaturizante. Por último, el gel se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en solución de tinción para proteína total BlueSafe (Nzytech).

### **2.3 Expresión y purificación de proteínas recombinantes para su uso en los sistemas de propagación *in vitro***

Las bacterias DE3 transformadas con el plásmido deseado se cultivaron en 50 ml de medio LB (Pronadisa) en presencia de ampicilina (20 µg/ml) a 37 °C en agitación a 200 rpm durante toda la noche. A continuación, estos 50 ml se mezclaron con 2 l de medio LB con ampicilina (20 µg/ml) (Sigma-Aldrich) y se incubaron a 37 °C en agitación a 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica en la longitud de onda de 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0.8 - 1. Una vez alcanzada, se añadió al cultivo bacteriano IPTG (Gold Biotechnology) a una concentración final de 1 mM con el objetivo de inducir la síntesis de proteínas en las bacterias DE3. Una vez añadido el IPTG se mantuvieron las condiciones de temperatura y agitación descritas durante 3 h. Pasadas las 3 h, la inducción se detuvo mediante la incubación de los cultivos bacterianos en hielo durante 15 min. Finalmente, los cultivos se centrifugaron durante 15 min a una velocidad de 4500 g y a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall Legend XTR, Thermo Scientific) con el objetivo de precipitar las bacterias que acumulan la proteína recombinante producida en forma de cuerpos de inclusión.

El pellet bacteriano se resuspendió en 50 ml de buffer de lisis [50 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 5 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1 % Triton X-100 (Amresco), 1 mM PMSF (Sigma-Aldrich), 100 µg/ml Lisozima (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 8.0] y a continuación se incubó durante 30 min en agitación a 200 rpm a temperatura ambiente en presencia de 100 U/ml de deoxyribonucleasa (DNAsa) (Sigma-Aldrich) y 20 mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) (Sigma-Aldrich). El lisado se centrifugó a 4 °C durante 1 h a una velocidad

## MATERIALES Y MÉTODOS

de 8500 *g* (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific) y el material precipitado obtenido se resuspendió en 50 ml de buffer de lavado [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 150 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich), 1 % Sarkosyl (Sigma-Aldrich), pH ajustado a 8.0]. Con el objetivo de disolver totalmente los cuerpos de inclusión presentes en el precipitado, el lisado se centrifugó en las condiciones anteriormente descritas y el material precipitado se disolvió en 6 ml de buffer de inclusión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 0.5 M NaCl (Sigma-Aldrich), 6 M cloruro de guanidinio (Gnd-HCl) (Fisher Scientific), pH ajustado a 8.0] y se incubó a 37 °C en agitación durante toda la noche. A continuación, las muestras se centrifugaron a 4 °C durante 1 h a una velocidad de 8500 *g*. Los sobrenadantes se filtraron a través de filtros de jeringa con un tamaño de poro de 0.22 µm (Minisart, Sartorius Stedim) y se sonicaron 3 veces utilizando un sonicador de punta acoplado a un sistema Misonix Q-700 (Qsonica) con una amplitud del 60 % durante 15 s para reducir su viscosidad antes de la purificación.

Una vez filtrada y sonicada, la PrP recombinante presente en la muestra se purificó utilizando columnas de afinidad Ni-NTA HisTrap FF Crude 5 ml (GE Healthcare Amersham) acopladas a un sistema de FPLC (ÄKTA™ start, GE Healthcare Amersham). Las columnas se equilibraron con 35 ml de solución de unión [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 5 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M Gnd-HCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Seguidamente, la muestra se cargó en la columna, se lavó con 75 ml de solución de unión y finalmente la PrP se eluyó utilizando 30 ml de solución de elución [20 mM Tris-HCl (Fisher Bioreagents), 500 mM NaCl (Sigma-Aldrich), 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich), 2 M Gnd-HCl (Fisher Scientific), ajustado a pH 8.0]. Las proteínas purificadas se desnaturalizaron completamente aumentando la concentración de Gdn-HCl hasta 6 M y posteriormente se concentraron hasta alcanzar 1000 µM o 25 mg/ml mediante filtros de centrifugación con un límite de exclusión de 10 kDa (Amicon Ultra-15 10 kDa Centrifugal filter unit, Millipore). Finalmente, las proteínas recombinantes se almacenaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

La pureza de las proteínas recombinantes obtenidas y la eficacia del proceso de purificación se evaluaron mediante tinción de proteína total tras electroforesis en gel SDS-PAGE (Criterion TGX 4 – 15 %, Bio-Rad). A lo largo del proceso de purificación se fueron recogiendo fracciones de 10 µl de varios de los eluidos obtenidos. En concreto se recogieron muestras de 10 µl antes de cargar la proteína en la columna de afinidad (fracción de lisis), de la muestra filtrada tras su paso por la columna (fracción de carga) y de la proteína final purificada (fracción de elución). A continuación, se precipitaron añadiendo 56.7 µl de metanol frío (Fisher Chemical) y tras centrifugar durante 30 min a una velocidad de 19000 *g* a 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), el material precipitado se resuspendió en 16 µl de solución de carga NuPAGE (Invitrogen Life Technologies) diluido 1:3 en PBS (Fisher Bioreagents) y se cargó en el gel de electroforesis. Por último, el gel se incubó durante 1 h a temperatura ambiente en solución de tinción para proteína total BlueSafe (Nzytech).

### 3 PMCA para la propagación de priones *in vitro*

En este apartado se detallan la preparación de los dos tipos de sustratos utilizados para testar la capacidad inhibidora de la URO I *in vitro* y se describe el proceso de propagación mediante PMCA.

#### 3.1 Preparación de sustratos basados en homogeneizado de encéfalo de mamífero

Para evaluar la capacidad de inhibición de la URO I en un modelo más cercano a una situación *in vivo* respecto a la utilización de PrP recombinante, se utilizaron homogeneizados de encéfalos de ratones de genotipo silvestre (*wild-type*) o transgénicos que expresan PrP<sup>C</sup> de otras especies como sustrato, así como homogeneizados de otros mamíferos disponibles en el laboratorio. Los ratones transgénicos que se utilizaron en los diferentes experimentos realizados fueron: ratones Tg338, que sobreexpresan 6x la PrP<sup>C</sup> ovina V136, R154 y Q171 [280], ratones transgénicos TgVole, que expresa 1x la PrP<sup>C</sup> de topillo rojo con el polimorfismo I109 [65], ratones transgénicos TgWV, que expresan 1x la PrP<sup>C</sup> humana 129V [359], ratones Tg12, que expresan 2x la PrP<sup>C</sup> del wapití [360] y ratones Tg7, que expresa 1x la PrP<sup>C</sup> de hámster sirio [119, 361]. Los ratones se sacrificaron por inhalación de CO<sub>2</sub> y fueron perfundidos mediante punción cardíaca con 50 ml de solución de perfusión [PBS (HyClone, sin iones de Ca y Mg) y 5 ml de EDTA (Sigma-Aldrich)] con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de sangre posible. Utilizando un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem (Fisherbrand) los encéfalos perfundidos se homogeneizaron al 10 % (p/v) en solución de conversión fría (CB, del inglés Conversion Buffer) [0.15 M NaCl (Sigma-Aldrich), 1 % Tritón X-100 (v/v) (Sigma-Aldrich)] a la que se le había añadido previamente un inhibidor de proteasas (Complete™ Cocktail 1x, Roche). El proceso de homogeneización se realizó en su totalidad en hielo para evitar el calentamiento de las muestras debido a la fricción. Por último, los homogeneizados utilizados como sustratos para PMCA se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C hasta su uso. Por otro lado, para la realización de un experimento se utilizó encéfalo de vaca parda de montaña perfundido que se obtuvo a través del centro de Encefalopatías Espongiformes Transmisibles de Zaragoza (Universidad de Zaragoza). El encéfalo de vaca se complementó con 0.5 % (p/v) de dextrano sulfatado (Sigma-Aldrich) que promueve la propagación de los priones causantes de la encefalopatía espongiforme bovina. Igual que los sustratos basados en homogeneizados de encéfalo de ratón, se homogeneizó al 10 % (p/v) en solución de conversión fría con inhibidor de proteasas y tras la adición de dextrano se alicuotó y almacenó a -80 °C hasta su uso.

#### 3.2 Preparación de sustratos basados en PrP recombinante complementada con homogeneizado de encéfalo de pollo

Las PrP recombinantes de humano 129M y 129V se diluyeron 1:5 en PBS (Fisher Bioreagents) y se dializaron frente a PBS durante 1 h a temperatura ambiente empleando casetes de diálisis con un límite de exclusión de 10 kDa (Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette 10K MWCO, Thermo Scientific). Tras la diálisis, las muestras se centrifugaron a 19 000 *g* durante 15 min a una temperatura de 4 °C (Centrífuga Sorvall ST 16R, Thermo Scientific), con el fin de eliminar la proteína recombinante anormalmente plegada y que precipita como consecuencia del proceso de diálisis, y se recogió el sobrenadante que contenía la proteína soluble. Finalmente, medimos su concentración utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Fisher Scientific)

siguiendo el protocolo del fabricante. Para la técnica de PMCA se aceptó un rango de concentración de la proteína que oscila entre 0.5 mg/ml y 1 mg/ml, lo que equivaldría a, aproximadamente, entre 20 y 40  $\mu$ M. Dependiendo de la concentración de la proteína soluble tras la diálisis, esta se diluyó utilizando PBS o se concentró mediante filtros de centrifugación de 10 kDa (Microcon Ultra - 0.5 10 kDa, Millipore) hasta obtener una concentración dentro de este rango.

Con el objetivo de complementar los sustratos con factores que fomentan la propagación de priones presentes en el SNC y testar la URO I con PrP recombinante, pero en un modelo más parecido a una situación *in vivo*, se emplearon homogeneizados de encéfalo de pollo (*Gallus gallus domesticus*), que, aunque contiene su PrP<sup>C</sup>, no interviene en el proceso de propagación al no ser convertible. Debido a la complejidad de llevar a cabo la perfusión en estos animales, los cerebros fueron extraídos lo más rápidamente posible tras su decapitación en la planta de procesamiento y se lavaron externamente con solución de perfusión [PBS (Fisher Bioreagents), EDTA 5 mM (Sigma-Aldrich)] para eliminar la mayor cantidad de sangre posible. El proceso de homogeneizado se realizó del mismo modo que con los encéfalos murinos. Sin embargo, el homogeneizado resultante se centrifugó a 19 000 *g* durante 15 min a 4 °C para eliminar restos de tejido no homogeneizado correctamente, quedándonos con el sobrenadante. Por último, la PrP recombinante dializada y cuantificada se mezcló con el sobrenadante del homogeneizado de encéfalo de pollo a una ratio 1:10 (PrP recombinante:encéfalo de pollo), se alicuotó y se conservó a -80 °C hasta su posterior uso.

### **3.3 Propagación *in vitro* de priones mediante PMCA y testado de compuestos URO I y TMPyP-Fe(III)**

La propagación *in vitro* de priones se realizó basándose en el procedimiento de PMCA descrito por Castilla y colaboradores [51, 53, 258] que permite replicar la propagación de priones *in vitro* mimetizando el proceso que tiene lugar *in vivo*, pero con una cinética acelerada.

Todos los experimentos se realizaron en tubos de 0.2 ml de pared fina (Axygen) para favorecer la penetración de las ondas ultrasónicas. El volumen final empleado en todos los casos fue de 50  $\mu$ l. Se utilizó un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 min de incubación y 15 - 20 s de sonicación a una potencia del 60 - 80 %. La temperatura a lo largo del proceso se mantuvo constante a 38 °C utilizando un baño de agua circulante (Thermo Scientific). También se añadieron partículas de zirconio-sílice de 1.0 mm (BioSpec Products, Inc) para favorecer la homogeneidad de los resultados [362].

Para evaluar la capacidad antiprionica de los compuestos químicos mediante PMCA, se llevaron a cabo diluciones seriadas de las distintas semillas utilizadas para cada sustrato. Los inóculos utilizados se listan a continuación: hámster sirio 263K (aislado cedido por Robert Rohwer, Universidad de Maryland) para Tg7, Dawson para Tg338, sCJD VV2 (aislado cedido por Wenquan Zhou, Universidad Case Western Reserve) para TgWV, CWD (aislado cedido por Debbie McKenzie, Universidad de Alberta) para Tg12, Denovo-A-Vole (una cepa prionica generada en el laboratorio de forma espontánea) para TgVole, BSE

clásica (cepa priónica proveniente de la propagación por PMCA en el laboratorio) para el encéfalo de vaca y la cepa murina RML (cepa priónica proveniente de la propagación por PMCA en el laboratorio para el encéfalo de ratón. Basándonos en la experiencia previa del laboratorio, las diluciones de cada inóculo se adecuaron a la capacidad propagativa que presentan las diferentes semillas de priones utilizadas y del tipo de PrP recombinante o PrP<sup>C</sup> de mamífero del sustrato, y se indican en cada caso. Una vez realizadas las diluciones seriadas se añadieron los compuestos a testar a concentraciones variables que se indican en cada caso, de uroporfirina I hidrocloreuro (URO I) (Frontier Scientific) o 5,10,15,20-Tetrakis(N-metil-4'-pyridyl) porfinato de hierro (III) cloruro [TMPyP-Fe(III)] (Calbiochem). También se utilizaron como controles las mismas diluciones seriadas con vehículo Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich) como control positivo. A continuación, las diluciones seriadas se sometieron a 24 o 48 h de PMCA utilizando las condiciones especificadas anteriormente.

#### 4 Digestión de muestras con proteinasa K

La digestión con proteinasa K (PK) es el método por excelencia para la detección de PrP<sup>Sc</sup> en cualquier tipo de muestra, ya sea procedente de técnicas *in vitro*, *in cellula* o *in vivo*. Debido a que a lo largo de esta tesis doctoral se utilizaron diferentes métodos de propagación, las condiciones de digestión se adaptaron a los diferentes tipos de muestra utilizadas.

Las muestras procedentes de PMCA basadas en PrP recombinante complementada con encéfalos de pollo se digirieron de la siguiente forma: 10 µl de cada muestra se diluyeron 1:1 en PBS con 10 % de Sarkosyl (N-Laurilsarcosine sodium salt) (Sigma-Aldrich). A continuación, las muestras se digirieron utilizando una concentración de PK (Roche) de 85 µg/ml durante 1 h a 42 °C en agitación constante a 450 rpm utilizando un Thermomixer (Eppendorf). Por último, el proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 µl de solución de carga NuPAGE 4X (Invitrogen Life Technologies).

En los casos de las muestras de PMCA basadas en homogeneizados de encéfalos de mamífero se digirieron dependiendo de la muestra utilizada de la siguiente forma:

- Encéfalo de vaca: 5 µl de cada muestra se diluyeron 1:3 en PBS con 2 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 85 µg/ml.
- Encéfalo de ratón *wild-type*: 5 µl de cada muestra se diluyeron 1:3 PBS con 2 % de Tween-20 + 2 % de Nonidet P40 + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 85 µg/ml.
- Encéfalo ratón transgénico Tg338: 3 µl de cada muestra se diluyeron 1:6 en PBS con 2 % de Tween-20 + 2 % de Nonidet P40 + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 170 µg/ml.

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Encéfalo ratón transgénico TgWV: 10 µl de cada muestra se diluyeron 1:1 en PBS con 2 % de Tween-20 + 2 % de Nonidet P40 + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 170 µg/ml.
- Encéfalo ratón transgénico Tg12: 10 µl de cada muestra se diluyeron 1:1 en PBS con 2 % de Tween-20 + 2 % de Nonidet P40 + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 85 µg/ml.
- Encéfalo ratón transgénico Tg7: 10 µl de cada muestra se diluyeron 1: 1 en PBS con 2 % de Tween-20 + 2 % de Nonidet P40 + 5 % de Sarkosyl. Se digirieron a una concentración de PK de 85 µg/ml.
- Encéfalo ratón transgénico TgVole: 5 µl de cada muestra se diluyeron 1: 3 en PBS con 2 % de Tween-20 + 2 % de Nonidet P40 + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 85 µg/ml.

Todas las muestras de sustrato cuya PrP<sup>C</sup> provenía de un encéfalo de mamífero, se digirieron durante 1 h a 56 °C con agitación constante a 450 rpm utilizando un Thermomixer (Eppendorf). Y el proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 µl de solución de carga NuPAGE 4x (Invitrogen Life Technologies).

Las muestras de tejido de encéfalo y recombinante utilizadas como controles negativos sin digerir se prepararon de la forma siguiente, independientemente de su origen: 3 µl de sustrato de PMCA se diluyeron 1:6 en PBS.

### 5 Detección de proteínas mediante electroforesis y *Western blot*

La detección de PrP proveniente de las muestras sometidas a PMCA se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y *Western blot*. Todas las muestras, tanto digeridas con PK como no digeridas, se hirvieron durante 10 minutos a 100 °C. La separación proteica se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), y en todos los casos se utilizó para la separación proteica el sistema Criterion TGX gel 4 – 15 % (Bio-Rad), donde se cargaron 16 µl de cada muestra digerida con PK, excepto de los controles sin digerir, de los que se cargaron 4 µl. Los geles corrieron a 70 V 10 min, 110 V 10 min y 150 V durante aproximadamente 1 h. Para la transferencia de las muestras se utilizaron membranas adsorbentes de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF, Bio-Rad) y se realizó una electrotransferencia con el equipo Trans Blot Turbo System (Bio-Rad). Tras el bloqueo de la membrana utilizando solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] durante 1 h, la membrana se incubó con los anticuerpos primarios 3F4 (1:10 000) (Palex Medical) para la PrP humana y la PrP de hámster, Saf 83 (1:400) (Vitro S.A.) para la PrP de topillo rojo y la PrP de ratón *wild-type*, 12B2 (1:2 500) para la PrP de oveja (Central Veterinary Institute), Sha 31 (1:5 000) para la PrP de vaca (Bertin Pharma) y Bar 224 (1:1 000) para la PrP de wapití (Cayman chemical). Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo secundario policlonal anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific Pierce) para los anticuerpos primarios Saf 83, 3F4, Bar 224, 12B2 y Sha 31. Tras la incubación de cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente se realizaron

lavados (el primero de 10 min y tres más de 5 min) con una solución de PBS (Fisher Reagents) + 0.05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma-Aldrich). Por último, la membrana se reveló para la visualización de las bandas por quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el equipo FluorChem Q (Alpha Innotech) y el software Alphaview (Alpha Innotech).

### **6 Análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear de la interacción entre la UROI y la PrP recombinante humana**

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es un método potente y robusto para identificar y cuantificar las interacciones proteína-ligando debido a su resolución atómica. Gracias a su gran sensibilidad al entorno químico de los átomos que componen las señales de resonancia, esta técnica es capaz de distinguir distintos modos de unión entre proteína-ligando y su naturaleza química, siendo esta última muy útil en el desarrollo y optimización de compuesto terapéuticos farmacológicos. Por ello, decidimos caracterizar la interacción entre la UROI y la PrP recombinante humana mediante este método. El primer paso consistió en determinar el espectro de la proteína de manera aislada, para lo que utilizamos la recPrP humana 129M marcada con N<sup>15</sup> con una pureza 97 %.

La proteína marcada en estado soluble se llevó a una concentración de 75 µM en una solución de 20 mM de acetato de sodio (AcNa) (ajustado a pH 6.0) y a un volumen de 500 µl.

Dado nuestro interés en caracterizar la unión de URO I y la recPrP humana, paralelamente se preparó una solución stock a 2 mM de URO I en DMSO deuterado con el que procedimos a realizar una titulación. Todos los experimentos de titulación mediante RMN se realizaron en un Espectrómetro de RMN Bruker Avance III de 800 MHz equipado con una criosonda a una temperatura de 298 K. El programa de pulsos fhsqcf3gpqh [fast-HSQC, *phase-sensitive* ge 2D 1H-15N HSQC con *watergate* (3-9-19)] fue usado para obtener la correlación de los grupos HN unidos covalentemente entre los cuales destacan los grupos amina de la cadena principal y de algunas cadenas laterales (Arg, Trp, Gln, Asn). Cada espectro necesario para la determinación de la unión de URO I a recPrP conllevó 1 h de colecta y los espectros se procesaron con *TopSpin* 4.0.6. La asignación de los espectros se realizó usando el programa CCPNMR teniendo como referencia los desplazamientos químicos depositados en BMRB (del inglés, *Biological Magnetic Resonance Data Bank*) con número de acceso 4 402. El análisis de los desplazamientos químicos se realizó mediante scripts propios hechos en MatLab. Para la representación de los datos sobre la proteína recPrP se usó la entrada del PDB (del inglés, *Protein Data Bank*) número 1QLZ [363].

### **7 Estudios de permeabilidad de la uroporfirina I a la barrera hematoencefálica *in vitro***

Para realizar los estudios de permeabilidad *in vitro*, se utilizó un sistema capaz de mimetizar la barrera hematoencefálica. Para ello, se cultivaron tanto células endoteliales bEND.3 como astrocitos CTX-TNA2 (ambas obtenidas de la *American Type Cell Culture collection*, ATCC). Ambas líneas celulares se cultivaron

## MATERIALES Y MÉTODOS

con medios completos de cultivo de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Todos los cultivos celulares se mantuvieron en condiciones estándar (37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y un 95 % de humedad). Cuando las células alcanzaron una confluencia de entre el 70 y el 90 %, se subcultivaron en frascos nuevos. Para ello, se retiró el medio de cultivo, las células se lavaron con HBBS (*Hank's balanced buffer saline*) (Sigma-Aldrich) y se les añadió tripsina (Sigma-Aldrich) durante 3 - 6 minutos para despegarlas de la superficie y tenerlas en suspensión. Con las células en suspensión, la tripsina se neutralizó con medio completo [DMEM (Sigma-Aldrich) + 10 % FBS (Suero Fetal Bovino) (GIBCO)], y éstas se centrifugaron a 1500 g, a 21 °C durante 5 minutos, se contaron y se subcultivaron de nuevo en nuevos frascos T75 (Nunc EasYFlask 75 cm<sup>2</sup>) con medio completo.

Para la preparación del co-cultivo celular necesario para simular la BHE, los insertos, que van colocados individualmente en cada celda de las placas de 24 pocillos, se recubrieron con 25 µl cada uno de una solución de fibronectina (15 µl de la solución stock) (Sigma-Aldrich) y colágeno (35 µl de la solución stock) (Sigma-Aldrich) y se incubaron durante 1 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y un 95 % de humedad relativa, después los insertos se lavaron 3 veces con HBBS. Una vez lavados los insertos correspondientes, se sembraron las células bEND.3 a razón de 10 000 células por inserto (6x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>). Paralelamente, en las placas donde se incorporarán los insertos, se sembraron las células CTX-TNA2 a razón de 20 000 células por pocillo. Posteriormente, los insertos con las células bEND.3 se colocaron sobre los pocillos con las CTX-TNA2.

La integridad de la monocapa celular se verificó a través de la medición de la resistencia eléctrica transendotelial (TEER, del inglés *TransEndothelial Electrical Resistance*). La TEER se midió manualmente a diario utilizando un Volt-ohmetro EVOM2 acoplado a unos electrodos STX2 (*World Precision Instruments inc.*). Para calcular el valor TEER de cada inserto, a la resistencia de cada inserto con células se le restó la media de los valores de resistencia de tres celdas libres de células y este valor se multiplicó por la superficie del inserto (0.33 cm<sup>2</sup>).

El resultado se expresa en Ω\*cm<sup>2</sup>. Tras la medición del TEER, el medio de cultivo se reemplazó por medio BHE (medio completo e hidrocortisona a 500 nM).

Para testar la toxicidad de la URO I sobre la línea celular bEND.3 y sobre los astrocitos inmortalizados (CTX-TNA2), se realizó un ensayo de viabilidad celular sobre estas líneas a partir del ensayo colorimétrico MTT (bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio). Para ello, se cultivaron las células en una placa de 96 pocillos con medio completo, después de 24 h se retiró el medio y se le añadió medio completo nuevo con URO I (Frontier Scientific) a diferentes concentraciones, siendo la concentración máxima de 2 mM, y se incubó durante 24 h. Posteriormente, se le añadió el MTT (M6494, Invitrogen) a una concentración final de 0.5 mg/ml. Las placas se incubaron durante 2 h a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub> y a un 95 % de humedad. Al cabo de las 2 h, el medio fue retirado y se añadió 100 µl de DMSO (Sigma-Aldrich). Las medidas colorimétricas se realizaron utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm.

Para los estudios de permeabilidad, los insertos con un cultivo celular confluyente de las células bEND.3, se lavaron 3 veces con solución HBBS complementada con  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y sin rojo fenol (Sigma-Aldrich) y se transfirieron a una nueva placa, que contenía solución HBBS complementada con  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y sin rojo fenol en la zona basolateral. Por otro lado, se preparó la solución de estudio (100 o 200  $\mu\text{M}$  de URO I, HBBS,  $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$  y sin rojo fenol). Al inicio del ensayo, se añadieron 200  $\mu\text{M}$  de la solución de estudio en la zona apical de cada celda de la placa (donde están los insertos) y cada celda se incubó durante 1 h en agitación orbital de 60 rpm a 37 °C. La permeabilidad se midió en dirección apical-basolateral. A los 30 y 60 min se tomaron muestras del compartimento basolateral, y a tiempo 0 y a los 60 min de la zona apical. La concentración de URO I se analizó mediante HPLC/FL (Cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector de fluorescencia) (HPLC ALLIANCE 2695 y 474 Scanning Fluorescence Detector, Waters). El método cromatográfico que se siguió se explica más adelante.

El coeficiente de permeabilidad (Pe) de la URO I se calculó utilizando la siguiente ecuación, que permite obtener un valor de permeabilidad independiente de la concentración.

$$\frac{1}{PS} = \frac{1}{me} - \frac{1}{mf}$$
$$Pe_{\left(\frac{cm}{min}\right)} = PS/s$$

Donde PS es la permeabilidad y s la superficie del inserto (0.33  $\text{cm}^2$ ), me y mf son las pendientes de las curvas de aclaramiento con relación al tiempo correspondiente al inserto con células endoteliales (me) o sin células (mf). Cada condición se testó por triplicado.

Los valores obtenidos fueron las medias  $\pm$  la desviación estándar (SD, del inglés *Standard Deviation*), que fueron contrastados con una prueba de Levene para confirmar la homogeneidad de las varianzas entre los diferentes grupos y una prueba de Kolmogorov-Smirnoff para la normalidad. Para comprobar la existencia de diferencias entre los grupos, se realizó un t-test y un ANOVA de un solo factor con una prueba post-hoc de Bonferroni-Dunn, donde un valor  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

## 8 Descripción y generación de los diferentes modelos transgénicos murinos utilizados en los estudios *in vivo*

### 8.1 TgURO

El modelo TgURO con el que se realizaron diferentes experimentos fue desarrollado por el grupo de de Verneuil [357]. Los modelos se adquirieron a través de un repositorio de embriones europeo y, a partir de estos, se estableció nuestra propia colonia. Este modelo se caracteriza por poseer la mutación P248Q, que es una mutación puntual que causa un fenotipo severo en individuos humanos homocigotos debido a la deficiencia de la enzima uroporfirinógeno III sintetasa (UROIIIIS) en el caso de los individuos heterocigotos estos son completamente sanos y tienen la enzima funcional. Esta mutación también

## MATERIALES Y MÉTODOS

genera la misma deficiencia en la enzima de ratones. La mutación P248Q se realizó a través de mutagénesis dirigida, sustituyendo una adenina por una citosina, localizada en el exón 10. Los clones que contenían el constructo con la mutación se seleccionaron a través de un marcador de selección negativa. Una vez seleccionado los clones con la mutación, se generaron blastocitos con la mutación y se microinyectaron en ratones, generando quimeras. Las quimeras se cruzaron con ratones *wild-type* C57BL/6, se seleccionaron los animales heterocigotos y se cruzaron entre ellos hasta obtener animales homocigotos para la mutación P248Q [357]. Como causa del defecto en la *UROIIIIS*, los animales homocigotos poseen las siguientes características clínicas/fenotípicas causadas por la acumulación de URO I: orina de color escarlata, eritrodoncia, fotosensibilidad, esplenomegalia, hepatomegalia y huesos de coloración roja. Sin embargo, a pesar de su fenotipo, estos animales poseen una esperanza de vida similar a los animales *wild-type*, si se mantienen en unas condiciones de estabulación determinadas, ya que debido a su fenotipo requieren protección de la luz ultravioleta directa. Los niveles de URO I de estos animales que presentan la mutación P248Q en homocigosis varían entre 100 - 200  $\mu\text{M}$  en sangre, existiendo una amplia variabilidad entre individuos, mientras que los TgURO heterocigotos (HE) presentan un fenotipo igual a los *wild-type* y sus niveles de URO I son insignificantes, por lo que se han utilizado en determinados experimentos como controles de los TgURO homocigotos (HO).

### TgVole y TgVole 4x

El modelo TgVole fue desarrollado por nuestro grupo de investigación en colaboración con el del Dr. Glenn Telling (Universidad de Colorado) [65] y se caracteriza por presentar una susceptibilidad intrínseca a la infección por priones. La generación del modelo se realizó de la siguiente manera: la PrP del topillo rojo (BvPrP o volePrP), la cual codifica para una isoleucina en el residuo 109 se sintetizó de acuerdo con la secuencia de la BvPrP (GeneBank AF367624.1 y EF455012.1) sobre el que se realizó la mutación en el residuo 109 cambiando el codón ATG a ATT. El vector para transgénesis pJB, que contenía la secuencia de la PrP de ratón clonado previamente mediante la diana XhoI (MoPrP.Xho) fue modificado reemplazando el XhoI por BsiWI y FseI. La secuencia codificante BvPrP 109I fue clonada en el vector de transgénesis en los sitios BsiWI y FseI, confirmándose su secuencia mediante la secuenciación del DNA. El cassette de expresión transgénica fue liberado con NotI y microinyectado en un pronúcleo de oócitos FVB/N fertilizados con lo que se estableció una línea transgénica nombrada Tg(BvPrP-1109)C594<sup>+/-</sup>. Los niveles de expresión de BvPrP<sup>C</sup> en los cerebros de estos ratones transgénicos se determinó mediante *Western blot* y se comparó con ratones FVB *wild-type*. Los ratones Tg(BvPrP-1109)C594<sup>+/-</sup> (*aka* TgVole) expresaban los mismos niveles de PrP<sup>C</sup> que los ratones FVB *wild-type*, por lo que pasamos a nombrarlo TgVole. Este modelo presenta unas características fenotípicas muy similares a las del topillo rojo, como los cortos períodos de incubación cuando son infectados con determinadas cepas priónicas [284], además de poseer unos niveles de expresión de PrP<sup>C</sup> indistinguibles del topillo rojo [65].

## MATERIALES Y MÉTODOS

Respecto al modelo TgVole 4x, sobreexpresa hasta 4 veces la PrP<sup>C</sup> del topillo rojo, ya que posee varias copias del transgén fruto de un proceso de transgénesis idéntico al descrito para el TgVole, permitiendo así estudios de espontaneidad en un corto período de tiempo (desarrollan los primeros signos neurológicos a los ~150 - 200 días de edad de forma espontánea, a diferencia de los TgVole que no desarrollan patología espontánea a lo largo de su vida).

### TgURO - TgVole (TgVUR) y TgURO - TgVole 4x (TgVUR 4x)

Los modelos TgURO - TgVole y TgURO - TgVole 4x, también llamados TgVUR y TgVUR 4x, se utilizaron para diferentes experimentos de eficacia, tanto para enfermedades priónicas adquiridas como espontáneas, y fueron desarrollados por nuestro grupo a través de una serie de cruces sucesivos de las líneas presentadas anteriormente. El objetivo era obtener un modelo que expresara la mutación P248Q en homocigosis (URO<sup>+/+</sup>) y la PrP<sup>C</sup> 1x o 4x del topillo rojo en ausencia de la PrP<sup>C</sup> endógena murina. Los modelos TgVUR se utilizaron para los experimentos de inhibición de la propagación priónica cuando se infectaba al modelo con una cepa concreta (enfermedad adquirida). Por otro lado, los modelos TgVUR 4x se utilizaron para los experimentos de supervivencia cuando el modelo desarrolla la enfermedad de forma espontánea.

La primera fase de los cruces sucesivos para la generación de los modelos TgVUR 4x empezó con el modelo TgURO (HO), que expresaba la mutación P248Q<sup>+/+</sup> al que se le eliminó la PrP de ratón mediante cruces con animales *knock out* para la PrP de ratón (129/Ola de Manson *et. al*) [279]. Este cruce dio como resultado una progenie del 100 % con el genotipo ratónPrP<sup>+/-</sup> y URO<sup>+/+</sup>. Los ratones obtenidos de este cruce se cruzaron entre ellos dando como resultado una progenie con diversos genotipos, de los cuales se seleccionaron los que poseían el genotipo ratónPrP<sup>-/-</sup> URO<sup>+/+</sup>, con una proporción 1/16 del total, y el genotipo ratónPrP<sup>-/-</sup> URO<sup>-/+</sup>, siendo esta 2/16 del total. Los animales seleccionados se cruzaron entre ellos dando la mitad de la progenie con el genotipo ratónPrP<sup>-/-</sup> URO<sup>+/+</sup> y la otra mitad ratónPrP<sup>-/-</sup> URO<sup>-/+</sup>. Los animales resultantes con el genotipo ratónPrP<sup>-/-</sup> URO<sup>+/+</sup> se cruzaron con el modelo TgVole 4x dando como resultado, en la mitad de la progenie, un TgVUR 4x (HE), cuyo genotipo tenía la ratónPrP<sup>-/-</sup>, URO<sup>+/+</sup> y volePrP<sup>+/-</sup>. Estos animales resultantes se cruzaron entre ellos hasta obtener un TgVUR 4x homocigoto [TgVUR 4x (HO)] que poseía la ratónPrP<sup>-/-</sup>, volePrP<sup>+/-</sup> y URO<sup>+/+</sup>, en una proporción 2/16.

Para obtener los modelos TgVUR (HO), con los que se realizaron los estudios de supervivencia, se utilizó el modelo animal preexistente TgURO (HO) que no presenta la PrP de ratón (ratónPrP<sup>-/-</sup> URO<sup>+/+</sup>), el cual se obtuvo para los estudios de espontaneidad, y se cruzó con el modelo TgVole. De estos cruces se obtuvo toda la progenie con el genotipo ratónPrP<sup>-/-</sup>, URO<sup>+/+</sup> y la volePrP<sup>+/-</sup>. Estos animales se cruzaron entre ellos hasta obtener los TgVUR ratónPrP<sup>-/-</sup>, URO<sup>+/+</sup> y la volePrP<sup>+/-</sup>, en una proporción de 1/16 del total de la progenie.

### **8.2 Proceso de trasplante de médula ósea de ratones TgURO homocigotos en ratones de genotipo silvestre/*wild-type***

En este apartado se explicará todo el proceso de trasplante de médula ósea desde la extracción de células hematopoyéticas de los animales donantes necesarias para inducir el cambio de fenotipo hasta la ablación de la médula ósea de los animales receptores y el propio proceso de trasplante.

#### **8.2.1 Procedimiento de ablación de la médula ósea**

La ablación de la médula ósea consiste en la eliminación de la médula ósea propia del huésped para introducir una nueva de un receptor escogido, lo que en este caso se realizó mediante la irradiación de los animales receptores.

Los animales receptores de médula, de genotipo silvestre, se irradiaron 24 horas antes del proceso de trasplante. Nosotros utilizamos para la irradiación una fuente de Cs<sup>137</sup> en el equipo de irradiación gamma modelo Gammacell 1000 Elite (MDS Nordion), del Laboratorio de Imagen Molecular perteneciente al SEA de la Universidad de Salamanca. Este equipo proporciona una tasa de radiación de 243 cGy/min, con una energía de emisión de 0.662 MeV. Los animales se dispusieron dentro de un contenedor cilíndrico compartimentalizado, donde cada animal se encontraba de forma individual. Este contenedor gira durante la exposición a la fuente de Cs<sup>137</sup>, de manera que todos los ratones recibieron una dosis de radiación homogénea. La dosis que se les administró fue de 7.5 Gy, siendo la dosis letal mínima, es decir, la dosis más baja que permite la eliminación de la médula [364, 365]. Después de la realización del proceso de irradiación, los animales se mantuvieron separados en jaulas con sistemas de ventilación independiente para animales inmunodeprimidos del SEA de la Universidad de Salamanca.

#### **8.2.2 Extracción de células hematopoyéticas de la médula ósea**

Los animales donantes, homocigotos de la línea TgURO, se seleccionaron de acuerdo con su edad, escogiendo los que tenían entre 60 y 100 días. La extracción de células hematopoyéticas procedentes de la médula ósea se realizó a partir de las tibias y los fémures de los animales donantes. Para ello, se sacrificaron por dislocación cervical e inmediatamente después, se limpió la zona dorsal, lumbar y de las patas traseras con etanol al 70 % (v/v), se cortó la piel y se desolló la zona de las patas traseras. Tras la separación de la piel, las patas traseras se cercenaron a la altura de la cadera y el tobillo. Una vez los miembros estaban separados, se procedió a separar el músculo del hueso, dejando tanto la tibia como el fémur lo más limpio posible de cualquier tejido externo. A continuación, y en una cabina de flujo laminar, con una aguja de 26 o 27 G se agujerearon las epífisis de los huesos hasta que no se detectó resistencia. Después, con una jeringuilla, se introdujo en los huesos previamente agujereados, unos ~6 ml de medio IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium*) (Invitrogen), el producto obtenido del lavado con IMDM se recogió en un Falcon® de 50 ml con un tamiz de 70 µM (BD Falcon) (Bedford), previamente

humedecido con el medio IMDM. La médula extraída se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se conservó el precipitado. El precipitado puede presentar un color rojizo debido a la presencia de eritrocitos, que se deben descartar para tener solo las células hematopoyéticas aisladas. Por lo tanto, el precipitado se resuspendió en 5 ml de solución de lisis de eritrocitos [140 mM NH<sub>4</sub>Cl (Sigma-Aldrich) en Tris-base 17 mM (Sigma-Aldrich), ajustado a pH 7.4] y se dejó actuar durante 5 min, para finalizar la reacción se añadió PBS hasta 50 ml. En este momento se tomaron 100 µl de la muestra y se mezclaron con 100 µl de azul tripán (Sigma-Aldrich) para contar el número total de células viables extraídas utilizando una cámara Thoma. Para ello, se depositaron 10 µl de la muestra mezclada con el azul tripán en la cámara y se contaron todas las células que se observaban por 10 000 [volumen líquido contenido en la cuadrícula (1 mm x 1 mm x 0.1 mm)] por el volumen de la muestra de PBS más el buffer de lisis por 2 (dilución derivada de la adición del azul tripán).

$$\text{Cél. extraídas} = \text{cél. observadas} * 10000 * (\text{Vol. muestra} + \text{vol. buffer lisis}) * 2$$

Paralelamente, el resto de la muestra se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min a 4 °C. Para finalizar, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en un volumen determinado de PBS, el cual venía definido por el número de células extraídas, siendo el mínimo 7.5x10<sup>6</sup> células para trasplantar por animal, en un volumen máximo de 150 µl. Las muestras de células de médula ósea extraídas fueron conservadas a 4 °C hasta el trasplante, el cual debía de llevarse en un tiempo inferior a 3 h desde la extracción para asegurar la viabilidad celular.

### **8.2.3 Trasplante de las células hematopoyéticas**

Tras la extracción de médula ósea de los animales donantes [(TgURO (HO))], se realizó el trasplante en los animales receptores (ratones de genotipo silvestre) por vía intravenosa a través del plexo retroorbital [364, 366]. Para realizar la intervención, se anestesió a los animales receptores de la médula con anestesia inhalada del tipo isoflurano (Isoflo, Ecuphar) mediante una caja de inducción conectada a un equipo de anestesia (CA-EAC20, CIBERTEC) hasta que el animal adquirió un plano anestésico profundo, después se inoculó con una aguja de 30 G a través del plexo retroorbital, una concentración variable de células hematopoyéticas con un volumen máximo de 150 µl. Una vez se realizaron las inoculaciones, los animales receptores se trasladaron a jaulas de ventilación independiente y no se les realizó ninguna manipulación hasta pasado un tiempo mínimo de dos semanas. Este tiempo es el mínimo necesario para asegurar que la médula se ha injertado completamente y el trasplante ha funcionado, ya que, si esto no fuera así, el animal fallecería en este período de tiempo. Una vez pasado este período, los animales pudieron ser estabulados en condiciones normales.

### 9 Estudios de infectividad *in vivo*

Para determinar si elevadas concentraciones de URO I mostraban la capacidad de inhibir la propagación priónica *in vivo*, se utilizaron los modelos animales generados previamente, tanto inoculados con diferentes cepas priónicas como los que presentan enfermedad priónica esporádica.

En aquellos modelos de enfermedad priónica adquirida, los animales se anestesiaron con ketamina (75 mg/kg) (IMALGENE 100mg/ml solución inyectable, Merial) mezclada con medetomidina (1 mg/kg) (DOMTOR 1 mg/ml solución inyectable, Ecuphar) y como reversor se empleó el atipamezol (1 mg/kg) (Reverse 5 mg/ml solución inyectable, Fatro) intraperitoneal y se inocularon con priones intracerebralmente utilizando una aguja hipodérmica de calibre 27 G con 15 - 20 µl del inóculo de interés homogenizado al 10 % (p/v) y diluido 1:10 en PBS (inóculo al 1 % final).

La evolución de la fase clínica, tanto para los animales inoculados como para aquellos que desarrollaban la enfermedad espontáneamente, se evaluó mediante la observación de signos clínicos en los animales de forma continua (monitorización diaria). Para considerar que un ratón tenía una sintomatología asociada a una enfermedad espongiforme transmisible (EET) y por consiguiente proceder a eutanasiarlo, fue necesario detectar un mínimo de tres signos clínicos de disfunción neurológica de manera simultánea. Los signos clínicos evaluados fueron:

- Andar anadeante.
- Pelo erizado, áspero o alborotado.
- Cabeza embotada (poco alerta, no sigue estímulos externos con la cabeza).
- Mayor excitabilidad.
- Incontinencia urinaria.
- Espalda aplanada.
- Anormalidad evidente en la marcha.
- Descargas oculares pegajosas (legañas).
- Pérdida de peso.
- Animal con joroba y/o encorvado (cifosis).

Cuando la progresión de la enfermedad era evidente (con al menos 3 de los signos mencionados detectados simultáneamente) se procedió a la eutanasia de los animales por razones éticas mediante dislocación cervical o inhalación de CO<sub>2</sub> para la toma de muestras biológicas. Las muestras extraídas fueron: sangre completa en tubos con EDTA (Microtainer, BD), bazo y encéfalo completo. Con relación al encéfalo, se realizó un corte longitudinal de manera que se separaron los dos hemisferios. Uno de los hemisferios cerebrales se congeló y almacenó a -80 °C para su posterior examen bioquímico mediante *Western blot*, mientras el otro se fijó inmediatamente en paraformaldehído al 4 % (Sigma-Aldrich) para estudios histopatológicos. La sangre fue alicuotada y congelada a -20 °C para su posterior análisis

mediante HPLC y el bazo fue congelado a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  para utilizar como semilla en PMCA y para su posterior estudio bioquímico mediante *Western blot*.

### 10 Estudios estadísticos para la obtención de las curvas de supervivencia

El procesamiento y análisis de los datos obtenidos de los estudios *in vivo* de supervivencia y de los datos de URO I obtenidos mediante HPLC, se realizaron a través del programa estadístico SPSS.

Para empezar, en todos los casos, los datos fueron sometidos a un análisis descriptivo. Los resultados fueron contrastados con una prueba de Levene para confirmar la homogeneidad de las varianzas entre los diferentes grupos y una prueba de Kolmogorov - Smirnov para la normalidad.

Para analizar los datos de supervivencia se realizó una prueba de Kaplan-Meier y los datos se contrastaron con un test *log-rank*, donde se consideró un valor  $p < 0.05$  estadísticamente significativo.

Las pruebas de correlación se realizaron a través de la prueba Rho de Spearman, donde un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

Por otro lado, para comprobar la existencia de diferencias entre los niveles de URO I entre los diferentes grupos de estudio, se realizó una prueba U de Mann-Whitney, donde un valor  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

### 11 Estudios neuropatológicos

Uno de los hemisferios de los cerebros procedentes de los ensayos de infectividad *in vivo* fue fijados en paraformaldehído al 4 % (Alfa Aesar) y se deshidrataron a través de concentraciones crecientes de alcohol, a través de xileno y finalmente se incluyeron en parafina. Las seis secciones encefálicas analizadas para cada muestra fueron: hipocampo, tálamo, corteza cerebelosa, cerebelo, cuerpo estriado y tronco encefálico. Secciones de  $4\text{ }\mu\text{m}$  se montaron sobre portaobjetos de vidrio y se tiñeron con hematoxilina - eosina (HE) para su evaluación morfológica. Los cortes se montaron sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con 3-trietoxisilil-propilamina para los estudios inmunohistoquímicos.

El estudio inmunohistoquímico (IHQ) para la observación de la PrP<sup>Sc</sup> se realizó previo tratamiento de los cortes desparafinados en ácido fórmico y ebullición a pH bajo en una olla a presión. Las peroxidases endógenas se bloquearon y las muestras se pretrataron con PK y se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario 6C2 (Prionics AG, 1:1 000). El revelado se realizó utilizando el sistema DAKO EnVision [polímero conjugado a los anticuerpos secundarios con peroxidasa] junto con la 3,3'-diaminobencidina (como sustrato cromógeno) para visualizar los depósitos de PrP<sup>Sc</sup>.

La evaluación positiva de los animales a través de HE se determinó por cambios espongiiformes, presencia de vacuolización (intra-neuronal) o espongiosis (en el neuropilo) de la sustancia gris. Se trató de discernir la espongiosis causada por EETs de la que se podía deber a la neurodegeneración neuronal asociada a la edad (sustancia blanca) o de la relacionada con la sobreexpresión de la proteína del prion (cuerpo calloso

y capas profundas de la corteza, sin estar asociada a depósitos de PrP<sup>Sc</sup>). En los ensayos de IHQ se buscaron depósitos de proteína mal plegada, minimizando el marcaje de la PrP<sup>C</sup> e identificando patrones de acumulación específicos de la PrP<sup>Sc</sup>: patrón punteado, granular fino, intraneuronal, linear (axones), placas (extracelular), estrellado (células gliales) y perivascular.

### 12 Determinación de los niveles de uroporfirina I en diferentes tejidos por HPLC

#### 12.1 Procesamiento de encéfalo y sangre

La URO I se encuentra de forma natural en el citosol de las células, por eso mismo se debe extraer para poder medir de forma precisa los niveles de URO I presentes en solución. Para la correcta medición, todas las muestras se procesaron por triplicado.

En el caso de las muestras de encéfalo, se le añadió HCl (T3Q) 6 M en una proporción 1:10 (encéfalo:HCl), se le añadieron partículas de zirconio de 2.3 mm (BioSpec Products, Inc) y se homogeneizó en un homogenizador Tissulyser (QIAGEN) durante 10 min, repitiendo si no se hubiera homogeneizado correctamente. Después, se sonicaron las muestras 6 veces con un ciclo de 30 s de sonicación y 60 s de incubación a 37 °C a un 60 % de amplitud, en un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica). Después, se incubaron las muestras en una estufa a 37 °C durante 30 min, se centrifugaron 10 min a 19 000 g para eliminar los restos de tejido y fibras y se congelaron las muestras del sobrenadante obtenido a -80 °C. Posteriormente, las muestras se filtraron utilizando filtros de centrifugación con un tamaño de poro de 0.22 µm (Corning Costar Spin-X), centrifugados 10 min a 4 °C y 15 000 g. Este proceso se repitió hasta que la muestra estuvo completamente filtrada. Finalmente, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su procesamiento por HPLC.

El proceso de extracción de la URO I en sangre se realizó de forma similar al que se utilizó para encéfalo, pero con ciertas variaciones. A las muestras de sangre se les añadió HCl 6 M en una proporción 1 : 10 y se agitaron vigorosamente en un vórtex para homogeneizar la muestra. Después, las muestras se sonicaron siguiendo los mismos ciclos que con las muestras de encéfalo (*vide supra*) y se incubaron en una estufa a 37 °C durante 1 h. Seguidamente, las muestras se congelaron a -80 °C. Posteriormente, se homogeneizaron las muestras y se filtraron a través de centrifugación a 15000 g durante 15 minutos a 4 °C en unos filtros de centrífuga con un tamaño de poro de 0.22 µm (Corning Costar Spin-X). Este paso se repitió hasta el completo filtrado de las muestras. Para acabar, las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis por HPLC.

#### 12.2 Método de procesamiento por HPLC

La detección de la URO I se realizó mediante un equipo de cromatografía líquida de alta eficacia HPLC ALLIANCE 2695 Waters acoplado a un detector de fluorescencia Waters 474 Scanning Fluorescence Detector (HPLC, del inglés *high performance liquid chromatography*). Las muestras procesadas se cargaron en una columna KROMASIL 100 C18 250 x 4.6 mm (Teknokroma, Thermo Scientific). La fase móvil consta de la mezcla de dos solventes, siendo la fase A acetato de amonio 0.1 M ajustada a pH 5.16 con

acético y la fase B de acetonitrilo al 100 %. El método cromatográfico utilizaba el gradiente siguiente: de 0 % a 65 % de fase B en los primeros 30 min, permanece 5 min al 65 % de fase B, pasa del 65 % al 0 % de fase B en 15 min y permanece al 0 % de fase B 10 min para reequilibrar la columna entre muestras. Todo ello se realizó con un flujo de 1 ml/min y las muestras se mantuvieron a una temperatura de 10 °C, mientras la columna se mantuvo a una temperatura de 25 °C. La concentración de URO I se midió con el detector de fluorescencia acoplado al HPLC (FL 405/610, Waters). Los volúmenes de inyección variaron dependiendo de la muestra, entre 5 y 20 µl. La URO I se observó a una longitud de onda de emisión de 405 nm y una de excitación de 610 nm. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### **12.2.1 Procesamiento de datos para la determinación de los niveles de URO I presentes**

Los valores de URO I obtenidos del análisis mediante HPLC fueron las medias  $\pm$  la desviación estándar (SD). Los resultados fueron contrastados con una prueba de Levene para confirmar la homogeneidad de las varianzas entre los diferentes grupos y una prueba de Kolmogorov - Smirnov para la normalidad. Para comprobar la existencia de diferencias entre los grupos, se realizó una prueba U de Mann-Whitney, donde un valor  $p < 0.05$  se consideró como estadísticamente significativo.

## **13 Procesamiento de bazos para detección de PrP<sup>Sc</sup> mediante PMCA**

Para la detección de PrP<sup>Sc</sup> en los bazos de los animales utilizados en los estudios de eficacia *in vivo* mediante PMCA, se extrajo y purificó parcialmente la PrP<sup>Sc</sup> antes de realizar el ensayo de propagación *in vitro* propiamente dicho.

Para la extracción de PrP<sup>Sc</sup>, se disgregó el bazo con un bisturí de hoja desechable y se homogeneizó con PBS con un 10 % de Sarkosyl (v/v) (Sigma-Aldrich). Después se re-homogeneizó en un disgregador de tejidos TissueLyser LT (QIAGEN) utilizando partículas de zirconio (BioSpec Products, Inc) de 2.3 mm de diámetro que favorecen la homogeneización. Las muestras se sonicaron con un sistema Misonix Q-700 con un sistema de microplaca (Qsonica) a un 60 % de amplitud hasta una aparentemente completa homogeneización del tejido. Posteriormente, se centrifugó 4 veces a 4000 g a 4 °C durante 15 min con el fin de eliminar el máximo posible de tejido fibroso no homogeneizado y se retiró el sobrenadante. Se preparó un colchón de sacarosa (Sigma-Aldrich) al 20 % (p/v) sobre el que se depositaron los sobrenadantes obtenidos de cada bazo. Las muestras se centrifugaron en tubos de 13 ml (Ultra-Clear™, Beckman Coulter) en una ultracentrífuga (Beckman - Coulter ultracentrífuga XL-100K) a 30 000 g a 4 °C durante 1 h. Finalmente, se descartaron los sobrenadantes y el precipitado de cada muestra se resuspendió al 10 % (p/v) respecto al tejido utilizado inicialmente, en una solución de PBS. Las muestras se congelaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La PrP<sup>Sc</sup> en solución extraída se utilizó como inóculo en un sustrato de homogeneizado de encéfalo de ratón *wild-type*. Utilizando un homogeneizador de tipo Potter-Elvehjem (Fisherbrand) los encéfalos perfundidos se homogeneizaron al 10 % (p/v) en solución de conversión fría a la que se le había añadido previamente un inhibidor de proteasas (Complete™ Cocktail 1, Roche). El proceso de homogeneización se realizó en su totalidad en hielo para evitar el calentamiento de las muestras debido a la fricción. Por último, los homogeneizados utilizados como sustratos para PMCA se alicuotaron convenientemente y se conservaron a -80 °C hasta su uso.

La propagación *in vitro* de priones se realizó mediante PMCA. Todos los experimentos se realizaron en tubos de 0.2 ml de pared fina (Axygen) para favorecer la penetración de las ondas ultrasónicas. El volumen final empleado en todos los casos fue de 50 µl. Se utilizó un sonicador Misonix Q-700 con sistema de microplaca (Qsonica) programado para llevar a cabo ciclos de 30 min de incubación y 15 - 20 s de sonicación a una potencia del 60-80 %. La temperatura a lo largo del proceso se mantuvo constante a 38 °C utilizando un baño de agua circulante (Thermo Scientific). También se añadieron partículas de zirconio-sílice de 1.0 mm (BioSpec Products, Inc) para favorecer la homogeneidad de los resultados (Fernández-Borges 2009).

Para evaluar la capacidad propagativa de la PrP<sup>Sc</sup> extraída de los bazo de los animales TgURO (HO) y los animales control de genotipo *wild-type*, se realizó una única dilución 1:5 (semilla:sustrato) de los distintos inóculos. También se utilizaron como controles positivos de propagación, los mismos sustratos inoculados con un homogenizado de encéfalo de un animal infectado con la misma semilla también a 1:5. A continuación, las diluciones se sometieron a 48 h de PMCA utilizando las condiciones especificadas anteriormente.

La propagación priónica se determinó mediante digestión con proteinasa K (PK) y *Western blot*. Las condiciones de digestión utilizadas fueron las siguientes: 15 µl de cada muestra se diluyeron 3:1 en PBS con 2 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich) + 2 % de Nonidet P40 (Sigma-Aldrich) + 5 % de Sarkosyl. Después, se digirieron a una concentración de PK de 85 µg/ml. Las muestras de sustrato se digirieron durante 1 h a 56° C con agitación constante a 450 rpm utilizando un Thermomixer (Eppendorf). Y el proceso de digestión se detuvo con la adición de 10 µl de solución de carga NuPAGE 4X (Invitrogen Life Technologies).

Todas las muestras, tanto digeridas con PK como no digeridas, se hirvieron durante 10 min a 100 °C. La separación proteica se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de poliacrilamida del 4 – 12 % que utiliza el sistema NuPage® Novex® (NuPAGE Midi gel, Invitrogen Life Technologies), y en todos los casos se utilizó para la separación proteica el sistema Criterion TGX gel 4 – 15 % (Bio-Rad), donde se cargaron 30 µl de cada muestra digerida con PK, excepto de los controles no digeridos, de los que se cargaron 4 µl. Los geles corrieron a 70 V 10 min, 110 V 10 min y 150 V durante aproximadamente 1 h. Para la transferencia de las muestras se utilizaron membranas adsorbentes de difluoruro de polivinilideno (PVDF, del inglés *PolyVinylidene DiFluoride*) (Trans-Blot Turbo Transfer Pack PVDF, Bio-Rad) y se realizó una

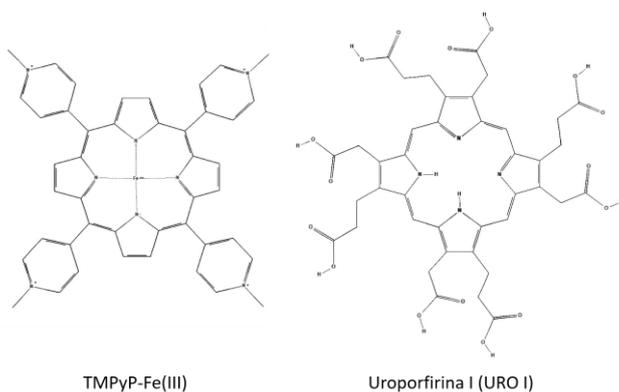
## MATERIALES Y MÉTODOS

electrotransferencia con el equipo Trans Blot Turbo System (Bio-Rad). Tras el bloqueo de la membrana utilizando solución de bloqueo [PBS (Fisher Bioreagents), 5 % (p/v) leche deslipidada, 0.05 % (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich)] durante 1 h, la membrana se incubó con el anticuerpo Saf 83 (1:400) (Vitro S.A.). Como anticuerpo secundario se utilizó el anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Thermo Scientific Pierce). Tras la incubación de cada anticuerpo durante 1 h a temperatura ambiente se realizaron lavados (el primero de 10 min y tres más de 5 min) con una solución de PBS (Fisher Reagents) + 0.05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma-Aldrich). Por último, la membrana se reveló por quimioluminiscencia utilizando el kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific Pierce) y la visualización de imágenes digitales se llevó a cabo utilizando el equipo FluorChem Q (Alpha Innotech) y el software Alphaview (Alpha Innotech).

## RESULTADOS

## 1 La uroporfirina I inhibe la propagación de priones *in vitro* con mayor eficiencia que el TMPyP-Fe(III)

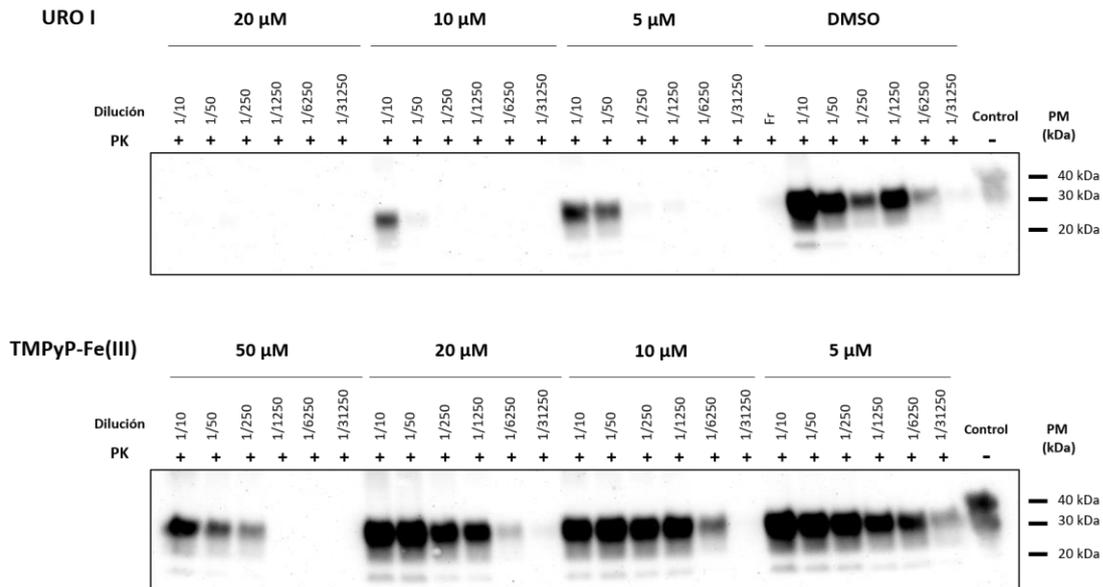
Dentro de las terapias existentes frente a las EET, una de las estrategias que mejores resultados ha logrado en términos de mayor número de posibles candidatos, es el uso de chaperonas farmacológicas capaces de unirse a la PrP<sup>C</sup> estabilizando su estructura y evitando el proceso de conversión [367]. En este grupo, uno de los compuestos que ha funcionado tanto en animales [339] como en células [338] y cuyos resultados han sido más destacables, ha sido el tetrapirrol TMPyP-Fe(III) [266]. El TMPyP-Fe(III) es un tetrapirrol de la familia de las porfirinas, un grupo muy amplio de moléculas que dada su similitud estructural se les presupone una potencial actividad antiprionica [368]. Por ello, se decidió escoger una porfirina cuya estructura fuera similar al TMPyP-Fe(III) (figura 7) y que, además, fuera un metabolito natural con el fin de que presentara una baja toxicidad celular. Debido a estas características, junto con otros aspectos como la disponibilidad de modelos animales, se decidió estudiar la capacidad de la uroporfirina I (URO I) para inhibir la propagación de priones. En la figura 7 se observa como la estructura del anillo central es común y las diferencias entre ambas porfirinas radican principalmente en sustituciones de los radicales unidos a los anillos pirrólicos.



**Figura 7. Estructura química de los tetrapirrolos: TMPyP-Fe(III) y uroporfirina I.** Ambos compuestos presentan estructuras químicas muy similares, compartiendo la estructura central del anillo pirrólico.

Dada su similitud, se evaluó primero si la capacidad inhibitoria de la propagación priónica de la URO I era equiparable a la del TMPyP-Fe(III), testando ambos compuestos en un sistema de propagación de priones *in vitro*. Para la comparación se utilizó la PMCA, una metodología que mimetiza *in vitro* lo que ocurre durante la propagación priónica *in vivo*. En un primer estudio se utilizaron homogeneizados de encéfalos de ratón de genotipo silvestre como sustrato y diluciones seriadas de la cepa murina RML que actuaban como semillas de propagación. La efectividad de los compuestos inhibidores TMPyP-Fe(III) y URO I añadidos a diferentes concentraciones, se evaluó mediante la cuantificación de la dilución máxima de semilla en la que se observaba propagación. Todas las muestras se sometieron a una ronda de PMCA de 48 h y los productos de la reacción se digirieron con proteinasa K (PK), monitorizando la presencia o ausencia de propagación mediante *Western blot*. Se puede observar como el TMPyP-Fe(III) a 50  $\mu$ M

(mayor concentración testada) inhibió hasta 25 veces la propagación, según la dilución máxima de semilla capaz de dar lugar a PrP resistente a proteasa (PrP<sup>res</sup>) detectable. Cantidades inferiores a esta concentración mostraron una inhibición casi inapreciable. Por el contrario, la URO I inhibió completamente la propagación a concentraciones inferiores, de hasta 20  $\mu$ M de compuesto, reduciendo la propagación hasta 125 veces cuando se utilizó el compuesto a una concentración de 5  $\mu$ M. Estos resultados evidencian que la URO I es un inhibidor más potente que el TMPyP-Fe(III) en las condiciones testadas (figura 8).



**Figura 8. Estudio comparativo de la capacidad de inhibir la propagación de priones *in vitro* de la uroporfirina I y el TMPyP-Fe(III).** Para evaluar la capacidad de inhibir la propagación de priones *in vitro* de cada compuesto, se realizó una PMCA de 48 h utilizando homogenizado de encéfalo de ratón *wild-type* como sustrato, inoculado con la cepa prionica murina RML a diferentes diluciones (1:10, 1:50, 1:250, 1:1 250, 1:6 250 y 1:31 250). A estas diluciones se les añadió uroporfirina I (URO I) (20, 10 y 5  $\mu$ M) o TMPyP-Fe(III) (50, 20, 10 y 5  $\mu$ M) y también DMSO (vehículo) como control de propagación en ausencia de compuestos inhibidores. Los productos resultantes se digirieron con proteinasa K (PK) y se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo primario Saf 83 (1 : 400). Tanto la URO I como el TMPyP-Fe(III) mostraron actividad inhibitoria de la propagación priónica, siendo la URO I más eficiente a menor concentración, ya que reduce hasta 625 veces la propagación a la menos concentración testada (5  $\mu$ M) respecto al control con vehículo. En comparación, se requirieron 50  $\mu$ M de TMPyP-Fe(III), para reducir la propagación 125 veces respecto al control con vehículo. PK: Proteinasa K, PM: Marcador de peso molecular.

## 2 La uroporfirina I presenta la capacidad de inhibir la propagación de distintas cepas de priones y de priones de diferentes especies *in vitro*

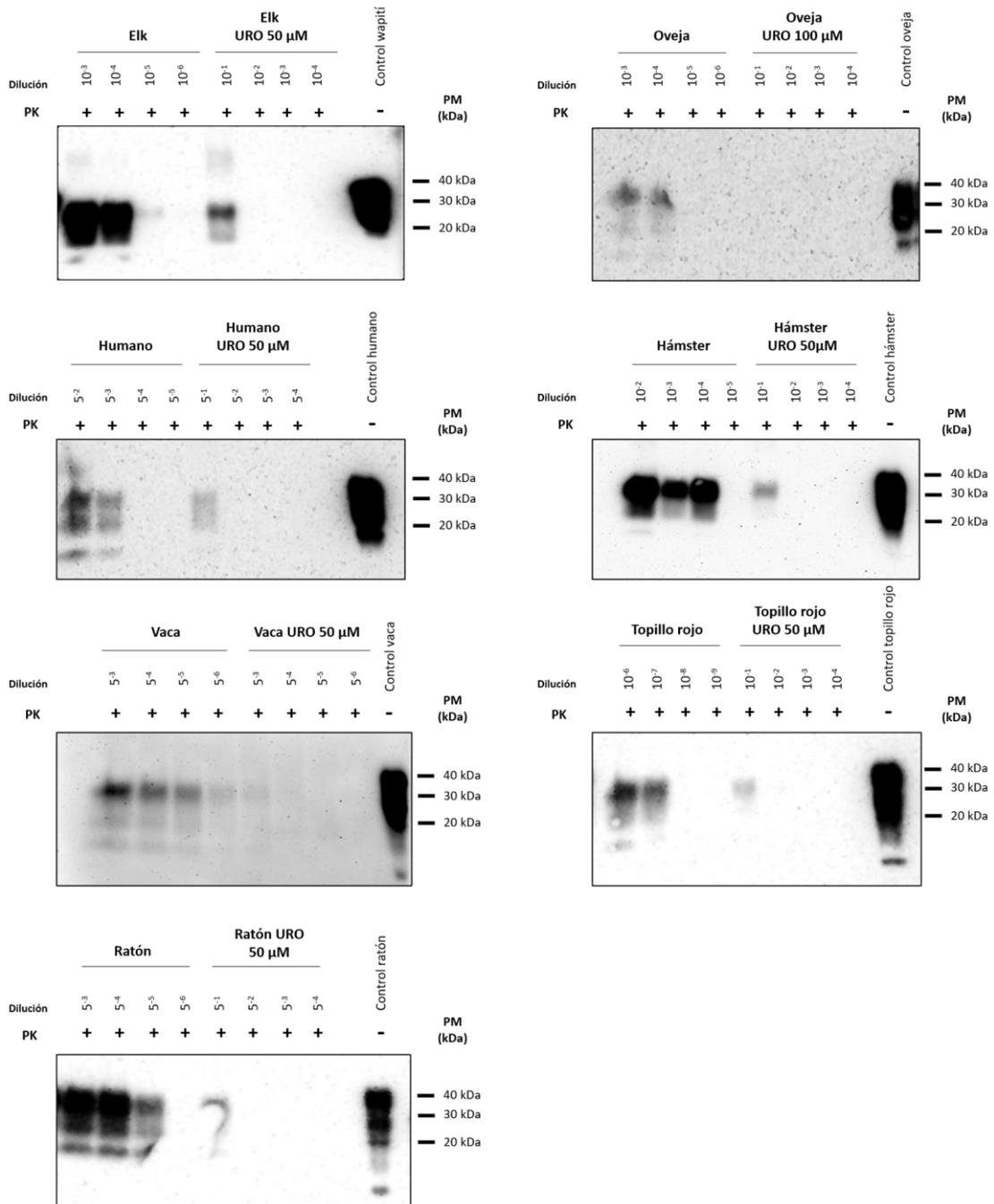
Una vez demostrada que la capacidad de la URO I de inhibir la propagación priónica *in vitro* es mayor que la del TMPyP-Fe(III), se quiso testar si la capacidad que presenta la URO I es dependiente de la cepa que se utilice como sustrato y/o inóculo. Así, para determinar si el mecanismo de acción de la URO I está relacionado con la especie y/o la cepa priónica a utilizar, se testó la actividad del compuesto *in vitro* tanto en diferentes especies, como en una misma especie inoculada con diferentes cepas priónicas.

### 2.1 La uroporfirina I presenta la capacidad de inhibir la propagación de priones de diferentes especies *in vitro*

Debido a las evidencias que demuestran que el TMPyP-Fe(III) actúa inhibiendo la propagación priónica mediante unión a la PrP<sup>C</sup>, evitando así el cambio conformacional [266] se hipotetizó que la URO I podría actuar de igual forma. Tanto si el mecanismo de inhibición de la URO I se debe a una estabilización de la PrP<sup>C</sup> como a una inhibición de la interacción PrP<sup>C</sup>- PrP<sup>Sc</sup>, podría ser que esta unión fuera muy específica y se diera solo en determinadas especies animales o que no pudiera interferir con la propagación de diferentes cepas priónicas. Por ello, para determinar si la capacidad de inhibir la propagación priónica que presenta la URO I es independiente de la especie, se generó un panel de diferentes homogeneizando encéfalos con las PrP<sup>C</sup> de distintas especies. Estos sustratos se obtuvieron tanto de ratones transgénicos que expresaban la PrP<sup>C</sup> de las diferentes especies, como en los casos en los que se tenía disponibilidad, de encéfalos perfundidos de la propia especie. Debido a que el objetivo era observar si el URO I es efectivo para las especies más relevantes en el campo de los priones, cada sustrato se inoculó con diluciones seriadas de cepas cuya capacidad de propagación *in vitro* era conocida y se les añadió 50 µM de la URO I, a excepción del sustrato de oveja, al cual se le añadió 100 µM, y DMSO, utilizado como vehículo al control positivo. Todo ello se sometió a una ronda de PMCA de 48 h, los productos obtenidos se digirieron con PK y se determinaron las diluciones máximas de semilla capaces de propagar respecto a sus controles mediante *Western blot*.

Los sustratos generados a partir encéfalos perfundidos de ratón transgénico fueron: Tg7 (encéfalo que expresa 1.5x veces la PrP<sup>C</sup> de hámster), Tg338 (encéfalo que expresa 6x veces la PrP<sup>C</sup> de oveja), TgZWV (encéfalo que expresa 3x veces la PrP<sup>C</sup> de humano con el polimorfismo 129V), TgElk (encéfalo que expresa 1.5x veces la PrP<sup>C</sup> de wapití) y TgVole (encéfalo que expresa 1x vez la PrP<sup>C</sup> del topillo rojo y que tiene el polimorfismo 109I). Los sustratos de origen bovino y murino se generaron a partir de encéfalos perfundidos de la especie silvestre correspondiente. Las semillas utilizadas de forma homóloga para cada uno de sus correspondientes sustratos se basaron en PrP<sup>Sc</sup> de hámster sirio 263K para Tg7, Dawson para Tg338, sCJD VV2 para TgWV, CWD para Tg12, Denovo-A-Vole para TgVole, BSE clásica para el encéfalo de vaca y la cepa murina RML para el encéfalo de ratón.

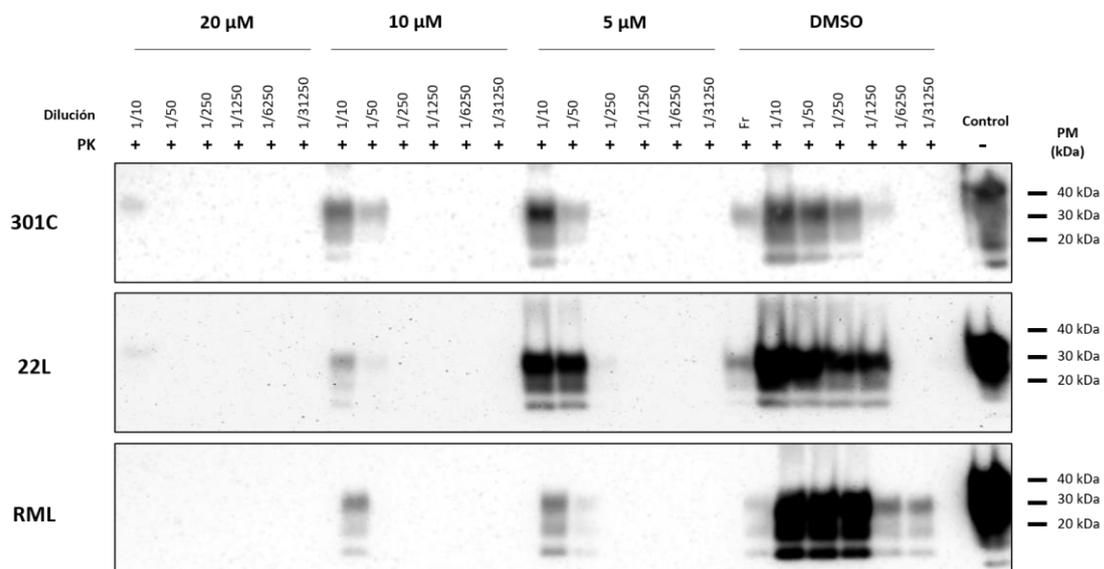
En la figura 9 se observa una inhibición de la propagación priónica independiente de la especie y para cada una de las semillas utilizadas. En todos los casos se muestra una ausencia en la propagación priónica en relación con la dilución máxima alcanzada en el control con vehículo. Estos resultados permiten concluir que la URO I es un potente inhibidor de amplio espectro capaz de inhibir la propagación priónica de todas las cepas/especies evaluadas.



**Figura 9. Evaluación de la capacidad de la uroporfirina I de inhibir la propagación *in vitro* de priones de distintas especies de mamífero.** Con el objetivo de determinar si la URO I presenta especificidad de especie, se realizaron varias PMCA utilizando como sustratos encéfalos homogenizados que contenían PrP de diferentes especies (oveja, ratón, wapití, topillo rojo, hámster, humano y vaca) a los que se añadieron sus respectivos inóculos en diluciones seriadas, adaptándolos a sus capacidades de propagación *in vitro*. A estas diluciones se les añadió URO I para obtener una concentración final de 50 μM, de 100 μM para el sustrato de oveja, y se sometieron a una ronda de PMCA de 48 h. Los productos resultantes se digirieron con Proteinasa K (PK) y se analizaron por *Western blot* utilizando los siguientes anticuerpos: Saf 83 (1:400) para ratón y topillo rojo, 12B2 (1:2 500) para oveja, Sha 31 (1:5 000) para vaca, 3F4 (1:10 000) para hámster y humano y Bar 224 (1:1 000) para wapití. La URO I muestra a 50 μM y 100 μM una inhibición en todas las especies testadas, por lo que se deduce que no presenta una gran especificidad de especie. PK: Proteinasa K, PM: Marcador de peso molecular.

**2.2 La uroporfirina I inhibe la propagación de diferentes cepas priónicas murinas in vitro a distintas concentraciones**

Con el objetivo de caracterizar la capacidad de la URO I como compuesto inhibidor de la propagación priónica, se estudió su efecto a distintas concentraciones utilizando tres cepas murinas. Basándonos en experimentos previos, las concentraciones del compuesto escogidas fueron de 20, 10 y 5  $\mu\text{M}$ , y las cepas utilizadas como semillas fueron: 22L, RML y 301C. Las dos primeras tienen como origen dos cepas de *scrapie* adaptadas a ratón y la última proviene de una cepa de BSE adaptada a ratón. Para este estudio consistente en una ronda de PMCA de 48 h a los sustratos preparados con homogenizados de ratón de genotipo silvestre se les añadieron diluciones seriadas de cada una de las cepas y las concentraciones indicadas de URO I. Los productos se digirieron con PK y las semillas que se propagaron a diluciones máximas en presencia de URO I se compararon con sus respectivos controles con DMSO mediante *Western blot* (figura 10).



**Figura 10. Determinación de la capacidad de la uroporfirina I de inhibir la propagación *in vitro* de priones de distintas cepas murinas.** Para determinar si la URO I podría presentar especificidad para distintas cepas de priones, se inocularon homogenizados de encéfalo de ratón con diferentes cepas murinas: 301C, 22L y RML; en diluciones seriadas (1:10, 1:50, 1:250, 1:1 250, 1:6 250 y 1:31 250). Se les añadió URO I en diferentes concentraciones (20, 10 y 5  $\mu\text{M}$ ) y se sometieron a una única ronda de PMCA de 48 h. Los productos de PMCA se digirieron con Proteinasa K (PK) y se analizaron por *Western blot* utilizando el anticuerpo primario Saf 83 (1:400). La URO I muestra una capacidad inhibitoria muy similar para las tres cepas utilizadas, reduciendo ~625 veces la capacidad de propagación a 5  $\mu\text{M}$ , ~3125 veces a 10  $\mu\text{M}$  y casi total a 20  $\mu\text{M}$  en los tres casos. PK: Proteinasa K, PM: Marcador de peso molecular.

En la figura 10 se observa que la URO I posee una alta capacidad de inhibición incluso a concentraciones bajas. Cuando se emplea como semilla la cepa 301C, a 20  $\mu\text{M}$  de URO I la inhibición es casi completa respecto el control positivo, observándose solamente la señal de la semilla añadida. Cuando se emplean 10  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , la inhibición es de unas 25 veces. En el caso de la cepa 22L, ocurre lo mismo que con la 301C y cuando se utiliza una concentración de 20  $\mu\text{M}$  la inhibición es casi completa, permaneciendo solo la señal de la semilla añadida. Con una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , la inhibición es de 125 veces y con 5  $\mu\text{M}$

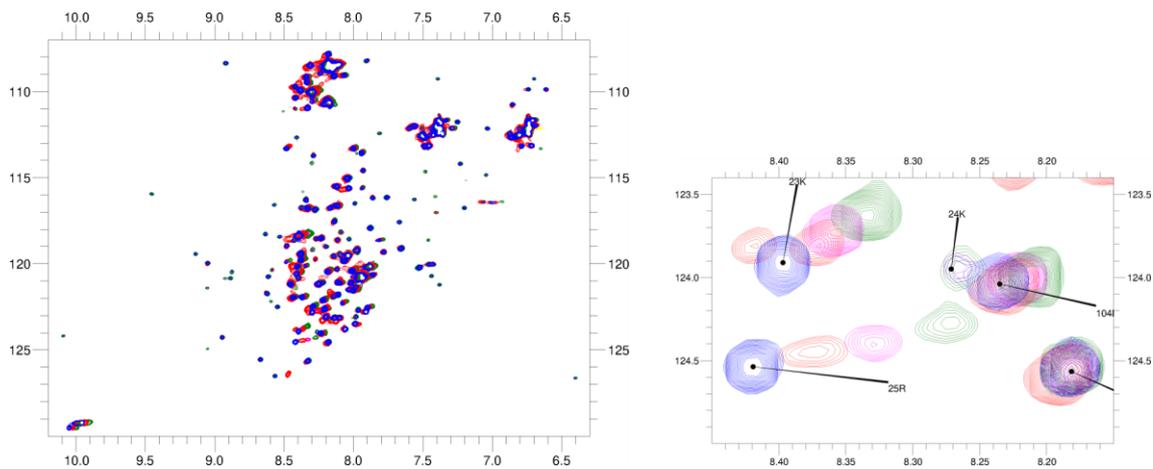
de 25 veces. Por último, con la cepa RML con 20  $\mu\text{M}$ , la inhibición es completa, respecto a la dilución máxima detectable en el control, y con 10 y 5  $\mu\text{M}$  se observa que es de aproximadamente de 625 veces. Estos resultados sugieren que la inhibición que muestra la URO I no es dependiente de cepa, si bien, el efecto final de la propagación de cada cepa varía ligeramente dependiendo de su capacidad intrínseca de propagarse *in vitro*.

### **3 La uroporfirina I se une a la proteína del prion humana e inhibe la propagación de priones humanos *in vitro***

Una vez demostrado que la URO I inhibía la propagación priónica de diferentes cepas priónicas, incluso de especies muy diferentes, los estudios se enfocaron en dilucidar los posibles mecanismos de acción a través de los cuales este compuesto ejercía su inhibición. Basándonos en estudios previos utilizando el tetrapirrol TMPyP-Fe(III), se testó su habilidad de unirse a la PrP recombinante humana utilizando resonancia magnética nuclear (RMN).

#### **3.1 La uroporfirina I interacciona directamente con la proteína del prion humana**

Los mecanismos de acción por los cuales determinados compuestos pueden inhibir la propagación priónica son muy variados. Como se ha evidenciado, la URO I es capaz de inhibir la propagación de priones *in vitro*, lo que indica que su principal mecanismo de inhibición no está a priori relacionado con ningún proceso celular. Dada su similitud molecular con la del compuesto TMPyP-Fe(III) es muy probable que la URO I comparta su mismo mecanismo de acción, sugiriendo por tanto que la inhibición de la propagación priónica la ejerce a través de su unión a la PrP, evitando así su malplegamiento. Para comprobar esta hipótesis y determinar la afinidad que presenta la URO I en su unión con este tipo de proteínas, se trabajó con la proteína recombinante humana con el polimorfismo 129M marcada con  $\text{N}^{15}$  dado su interés biológico. En una primera fase se obtuvo el espectro HSQC (del inglés *Heteronuclear Single Quantum Coherence*) en su conformación nativa, observándose los desplazamientos químicos de los grupos amina de los aminoácidos. Posteriormente, con el objetivo de establecer la constante de disociación (Kd), se obtuvieron diferentes espectros HSQC tras la realización de una titulación con las siguientes ratios molares de PrP:URO I: 1:0, 1:0.2, 1:0.5 y 1:0.75 (PrP:URO I). La comparación de los distintos espectros permitió observar cómo algunos residuos marcados sufrieron un desplazamiento debido a la perturbación causada por la unión con la URO I (figura 11). Si bien este estudio se diseñó con el fin de conocer la afinidad entre la URO I, y la PrP, cuando la concentración de URO I se superó la ratio 1:0.75 provocó la precipitación de la proteína impidiendo llegar al valor de saturación de la URO I y, con ello, impidiendo el ajuste a la ecuación de Hill para así obtener la Kd del complejo PrP - URO I. Por ese motivo, se procedió a la estimación de la IC50 (del inglés *half maximal inhibitory concentration*) mediante un ajuste de los datos a una función sigmoideal. Esto nos da una información aproximada de la alta capacidad inhibitoria del URO I donde se observa que con medio equivalente de URO I se llega a la IC50 con una estequiometría 1:1.



**Figura 11. Estudio mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de la interacción entre la uroporfirina I y la PrP 129M recombinante humana.** Para determinar si la URO I interacciona directamente con la PrP humana, se realizó un estudio mediante RMN, del que se obtuvo el siguiente espectro HSQC (del inglés *Heteronuclear Single Quantum Coherence*), donde se pueden observar los desplazamientos provocados por la interacción de la proteína con la URO I a distintas concentraciones. Las señales correspondientes a cada ratio (PrP : URO I) se indican mediante los siguientes colores: azul 1:0, rojo 1:0.2, rosa 1:0.5 y verde 1:0.75. En la zona aumentada del espectro se puede observar con más detalle una zona donde los desplazamientos de los aminoácidos son más acusados, indicando una mayor interacción con la URO I, de los residuos 23K, 24K, 25R y 104K de la PrP recombinante humana.

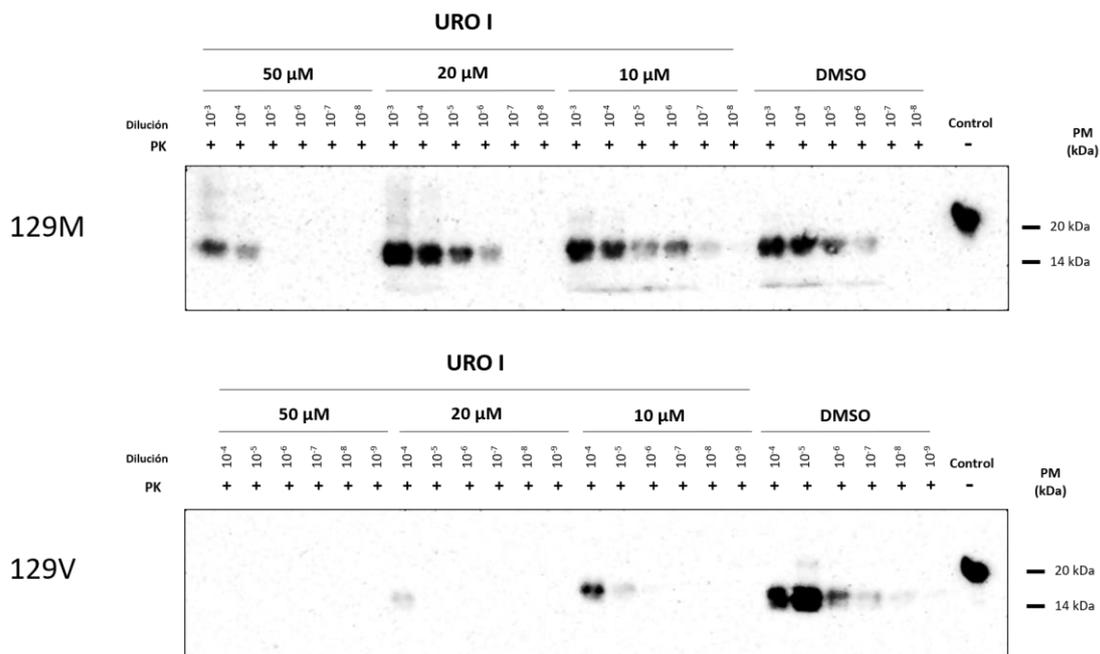
En la figura 11 se muestra el espectro HSQC donde cada color corresponde a una ratio PrP:URO I (azul 1:0, rojo 1:0.2, rosa 1:0.5 y verde 1:0.75). En el espectro se puede observar cómo existen cambios fácilmente apreciables en algunos aminoácidos conforme se aumenta la concentración de URO I. A destacar, la lisina de la posición 23, la lisina de la posición 24, la arginina de la posición 25 y la lisina de la posición 104, que se señalan en la zona aumentada del espectro. Otros residuos que cambian de entorno químico al interactuar con el URO I son el aspártico de la posición 167, la treonina de la posición 188, el glutámico de la posición 196 y el aspártico de la posición 201. Con todo ello, se puede decir que el N-terminal de la recPrP puede estar involucrado en cierta medida en la unión a URO I. Aunque estos desplazamientos más acusados también pueden deberse a diferentes motivos, entre ellos su interacción con el solvente o con el entorno químico que provoca el movimiento observable del aminoácido.

Por otro lado, y en relación con los datos de IC50, estos se obtuvieron para cada residuo con valores que van desde  $\sim 12 \mu\text{M}$  hasta  $45 \mu\text{M}$ . Teniendo en cuenta que los residuos que estén implicados en la unión de la proteína al compuesto se verán afectados en un tiempo menor, es decir, su CSP ocurrirá antes en la titulación, se estimó que el grupo de residuos cuyo valor de IC50 sea  $< 20 - 30 \mu\text{M}$  serán los que más cerca estén de la zona de unión con la URO I. Por todo ello, se calculó el valor promedio de todos IC50 de los residuos que cumplían esta condición y obteniéndose el valor de  $\text{IC}_{50} = 24.51 \mu\text{M}$ .

### 3.2 La uroporfirina I inhibe la propagación de priones recombinantes humanos *in vitro*.

Se ha observado que el mecanismo de acción de la URO I se basa en la unión con la PrP en su conformación nativa, por la que muestra una alta afinidad. Los espectros HSQC de URO I y PrP muestran los desplazamientos químicos que sufren algunos aminoácidos debida a la interacción de ambos, señalando

aquellos residuos que podrían intervenir en la unión. Uno de los aminoácidos que podría estar involucrado o al menos se ve afectado por la interacción entre el URO I y la PrP es la metionina de la posición 129. El polimorfismo 129 es un factor relacionado con la susceptibilidad genética a determinadas EET, dando en algunos casos signos clínicos específicos [369]. Por lo tanto, resulta de interés comprobar si esta posición puede alterar la capacidad de inhibición observada para la URO I con la PrP recombinante humana 129M por RMN. Por ello, se decidió comprobar si la presencia del aminoácido metionina o valina afecta la capacidad de inhibición de la URO I realizando un estudio de propagación *in vitro* con las proteínas humanas recombinantes 129M y 129V. Los sustratos se prepararon con las proteínas humanas recombinantes purificadas complementadas con homogeneizado de encéfalo de pollo y se inocularon con una semilla humana recombinante con la mutación P105L (asociada a patología priónica genética) obtenida previamente mediante PMCA y capaz de propagar tanto sobre la PrP humana con 129M como con 129V con una eficiencia similar. Como en ocasiones previas, se hicieron diluciones seriadas de la semilla y a cada dilución se le añadió 50, 20 o 10  $\mu\text{M}$  de URO I. Todos se sometieron a una PMCA de 24 h, los productos se digirieron con PK y se observaron por *Western blot* para determinar la dilución máxima de semilla a la que se observa propagación en presencia o ausencia de URO I.



**Figura 12. Evaluación de la capacidad inhibitoria de la uroporfirina I en la propagación *in vitro* de un prion recombinante humano.** Para analizar la capacidad de la URO I de inhibir la propagación priónica en ambos polimorfismos de la PrP recombinante humana, se realizó una única ronda de PMCA de 48 h con encéfalo de homogeneizado de pollo complementado con PrP recombinantes humanas con los polimorfismos 129M y 129V. Estos sustratos se inocularon con diferentes diluciones (1:10<sup>3</sup> - 1:10<sup>9</sup>) de una semilla recombinante humana obtenida previamente en PMCA, a las que se les añadió URO I hasta una concentración final de 50, 20 y 10  $\mu\text{M}$ . El producto resultante se digirió con Proteinasa K (PK) y se analizó por *Western blot* utilizando el anticuerpo 3F4 (1:10 000). En el caso del polimorfismo 129M se observa una reducción en la eficiencia de propagación de 10<sup>2</sup> cuando utilizamos una concentración final de 50  $\mu\text{M}$  de URO I, aunque no se observa inhibición a 20 y 10  $\mu\text{M}$ . En cambio, en el caso del sustrato que contenía proteína recombinante humana 129V, se muestra una inhibición de, mínimo, 5 logaritmos a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de URO I, de 4 logaritmos a 20  $\mu\text{M}$  y de 2 logaritmos a 10  $\mu\text{M}$ . Estos resultados destacan la importancia del polimorfismo 129 y cómo este podría influir sobre la inhibición o la interacción PrP – URO I. PK: Proteinasa K, PM: Marcador de peso molecular.

En la figura 12 se observa como existen diferencias en el grado de inhibición que muestra la URO I frente a la propagación priónica sobre sustratos basados en proteínas humanas que contienen ambos polimorfismos. En el caso de la recPrP 129M la inhibición empieza a observarse con una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de URO I siendo esta de un mínimo de 2 logaritmos. Sin embargo, en el caso de la recPrP con el polimorfismo 129V, la inhibición fue evidente a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (2 logaritmos de inhibición), llegando a 4 logaritmos de inhibición con 20  $\mu\text{M}$  y a un mínimo de 5, con 50  $\mu\text{M}$ . Estos resultados sugieren que el aminoácido en la posición 129 está implicado en la interacción con la URO I modulando como esta estabiliza a la proteína y, por tanto, alterando el grado de inhibición que ejerce el compuesto ejerce.

#### **4 Estudio preliminar de las propiedades farmacocinéticas del URO I**

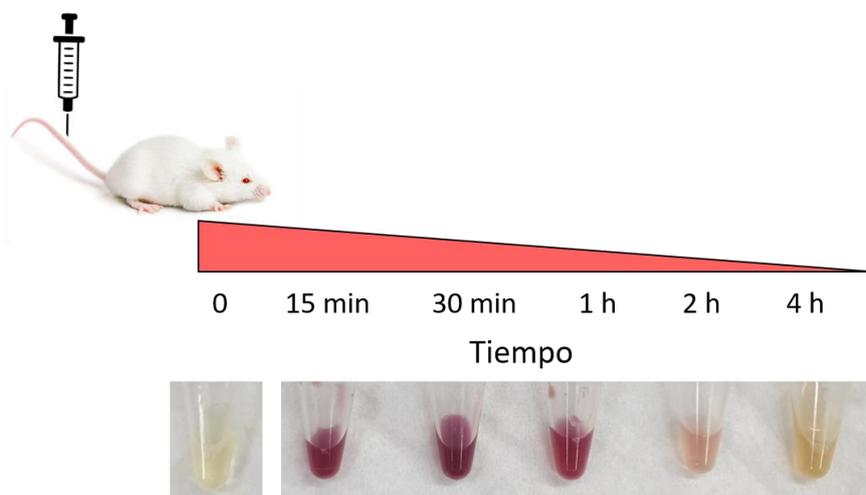
Una vez estudiada la potente inhibición de la propagación priónica *in vitro* que la URO I muestra en una gran diversidad de cepas y especies, es clave conocer como este compuesto se comporta *in vivo*. Es decir, es necesario estudiar cómo se absorbe, distribuye, metaboliza y excreta en aquellos modelos animales donde se realizarán las pruebas preclínicas enfocadas a evaluar su potencial terapéutico.

##### **4.1 La uroporfirina I se elimina rápidamente a través de la orina**

Con el fin de conocer si la URO I podría ejercer alguna acción sobre su órgano diana, el encéfalo, se realizó un estudio de sus propiedades farmacocinéticas tras su administración intravenosa. Para este estudio se utilizó un total de 15 ratones de la línea CD1 (genotipo silvestre), a los que se les inyectó por la vena lateral de la cola una solución a 2.1 mM de URO I en PBS. La URO I tiene una baja hidrosolubilidad a pH de entre 6 y 8, por ello, la máxima concentración inyectable por vía intravenosa en un tampón fisiológico es de 7.5 mg/Kg. Para medir la cantidad de URO I a lo largo del tiempo se recogió la orina y la sangre a los 15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 4 h y se analizaron mediante HPLC.

Las cantidades de URO I medidas por HPLC a partir de las muestras de sangre tomadas a los 15 min fueron indetectables a pesar de la sensibilidad del método. Por el contrario, el compuesto apareció rápidamente y en grandes cantidades en la orina sugiriendo que este una vez entra en el torrente sanguíneo se elimina de forma casi instantánea y principalmente a través de los riñones. La determinación de URO I en orina también se hizo de forma cualitativa, confirmando el resultado del HPLC. En la figura 13 se puede observar como la presencia de una alta concentración del compuesto en orina a los pocos minutos de su

administración colorea llamativamente esta y como a partir de los 15 min la coloración rojiza de la orina se reduce, eliminándose en su totalidad a las 4 horas.

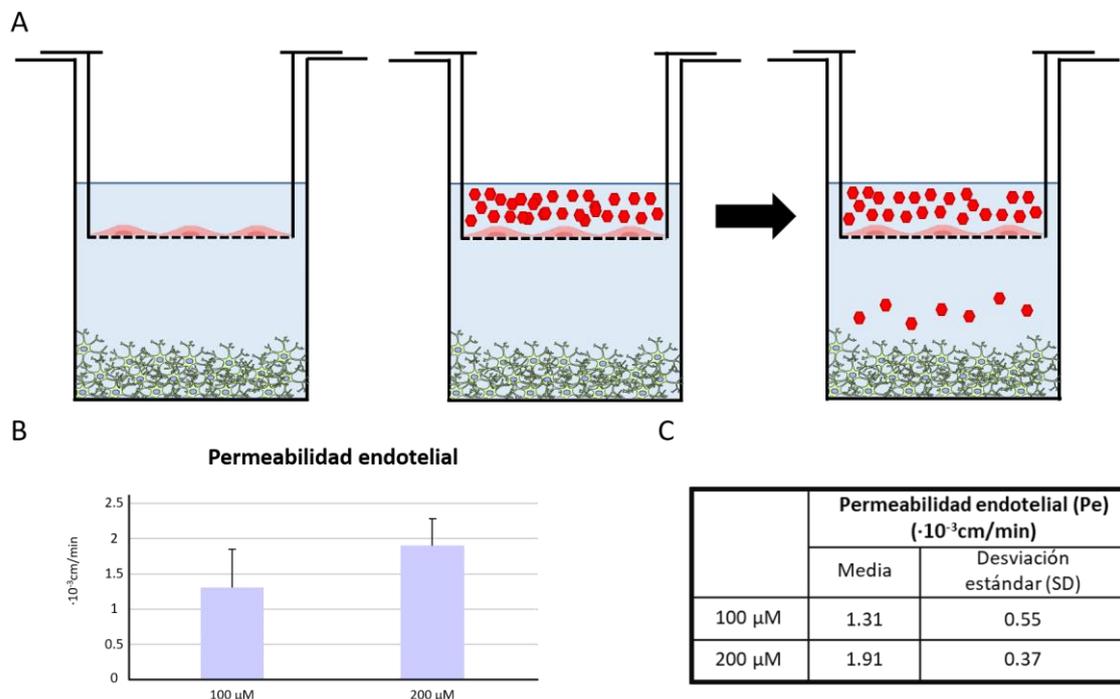


**Figura 13. Seguimiento de la eliminación de la uroporfirina I en ratones a través de la orina como parte de la determinación de sus características farmacocinéticas.** Para evaluar la farmacocinética del compuesto se realizó un ensayo *in vivo* con ratones CD1 a los que se les administró 7.5 mg/Kg de URO I de forma intravenosa. A continuación, se extrajo orina y sangre retroorbital a diferentes tiempos (15 min, 30 min, 1 h, 2 h y 4 h), y la cantidad de URO I presente en sangre se cuantificó por HPLC. Dado que no hay niveles detectables de URO I en ninguna de las muestras de sangre, no se muestran los resultados de HPLC. Por el contrario, se pudo observar la eliminación de una gran cantidad de URO I a los 15 minutos a través de la orina, habiéndose eliminado en su totalidad a las 4 horas. La presencia de URO I en muestras de orina se determinó cualitativamente, donde se puede seguir la presencia del compuesto por la coloración rojiza que otorga. Se observa una intensa coloración rojiza en las muestras recogidas a 15 y 30 min, así como una reducción importante en las próximas horas, obteniéndose orina del color habitual a las 4 h después de la administración del compuesto.

#### 4.2 Un modelo celular de barrera hematoencefálica muestra una baja permeabilidad a la uroporfirina I

Teniendo en cuenta que la URO I administrada de forma intravenosa se elimina en su totalidad en los primeros 15 min, mantener una concentración estable obligaría a administrarla de forma continua. Además, dado que su actividad inhibitoria debe ocurrir principalmente en el SNC, es esencial conocer cuál es su permeabilidad a la barrera hematoencefálica (BHE), en el supuesto de que se pudieran mantener concentraciones altas y persistentes en el torrente sanguíneo. Por ello, con el fin de testar la capacidad de la URO I de atravesar la BHE, se realizó un ensayo de permeabilidad *in vitro*. El ensayo se basó en la monitorización de la capacidad del compuesto para atravesar una barrera formada por una capa de células endoteliales que simulan la BHE. El experimento se realizó en cámaras de cultivo con dos compartimentos, uno apical y uno basolateral, utilizándose dos concentraciones diferentes (100 y 200  $\mu\text{M}$ ). La cantidad del compuesto que atravesaba la barrera celular se midió en la zona basolateral a los 30 y 60 min. Las distintas concentraciones de URO I en cada cámara se determinaron mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de fluorescencia (HPLC/FL, del inglés *High Performance Liquid Chromatography – Fluorimetric Detector*) y expresaron mediante el coeficiente de permeabilidad endotelial ( $P_e$ ), valor que indica la capacidad de permear de un determinado compuesto por superficie (en  $10^{-3}$  cm) y tiempo (en minutos). Se obtuvieron unos  $P_e$  de  $1.31 \cdot 10^{-3}$  cm/min  $\pm$  0.55 cuando se añadieron

100  $\mu\text{M}$  de URO I, y de  $1.91 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min} \pm 0.37$  cuando se añadieron 200  $\mu\text{M}$  (figura 14). Este dato refleja que la URO I tiene una capacidad muy limitada de atravesar la BHE, en relación con otros compuestos descritos (Dehouck 1992, Eingemann 2016). Esto sugiere que, para conseguir niveles terapéuticos en el SNC, además de ser necesaria una infusión intravenosa continua, esta se necesitaría realizar con una alta concentración del compuesto.



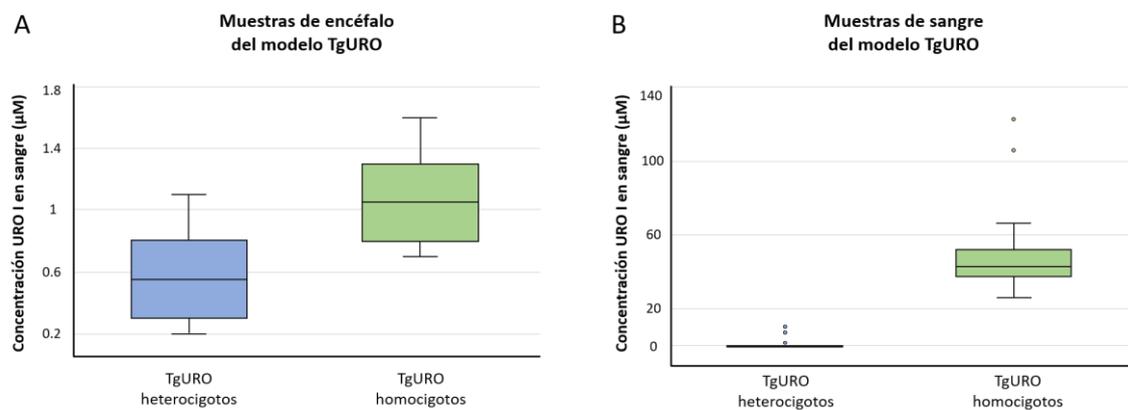
**Figura 14. Estudio de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica a la uroporfirina I *in vitro*.** A) Para examinar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE) a la URO I se realizó un ensayo *in vitro* basado en el co-cultivo de dos líneas celulares que simulan la BHE. Este modelo consta de una cámara de cultivo dividida en dos; con una parte apical y otra basolateral. En la parte apical están dispuestas sobre una rejilla, células endoteliales y en la zona basolateral un cultivo de astrocitos, que están fijados a la superficie. Se añadieron 100 y 200  $\mu\text{M}$  de URO I en la zona apical y se midió la concentración de URO I en la zona basolateral a los 30 y 60 minutos. Los resultados se midieron por HPLC acoplado a fluorescencia y se muestran como coeficiente de permeabilidad endotelial ( $\text{Pe}$ ), que indica la capacidad que tiene la URO I de atravesar la barrera hematoencefálica en  $\text{cm}/\text{min}$ . B y C) Representación gráfica de los resultados, donde se obtuvo una  $\text{Pe}$  de  $1.31 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min} \pm 0.5$  cuando se añadió URO I en la zona apical hasta una concentración de 100  $\mu\text{M}$  y una  $\text{Pe}$  de  $1.91 \cdot 10^{-3} \text{ cm/min} \pm 0.37$  a 200  $\mu\text{M}$ . Las medidas se realizaron por triplicado. Los valores se representan como las medias  $\pm$  la desviación estándar (SD). Estos resultados indican que el URO I tiene una capacidad muy limitada de atravesar la BHE.

## 5 La uroporfirina I causa un retraso en la manifestación de los signos clínicos en modelos animales de enfermedad priónica adquirida

Con el conjunto de los datos obtenidos de los estudios de farmacocinética y permeabilidad de la BHE, se descartaron las vías tradicionales de administración de fármacos. Se buscaron rutas de administración alternativas que consiguieran niveles suficientes y constantes de URO I en el encéfalo que inhibieran la propagación priónica *in vivo*.

**5.1 Los modelos animales TgURO presentan una alta y persistente concentración de uroporfirina I en sangre**

El grupo de de Verneuil desarrolló por primera vez un modelo transgénico que reproducía fielmente la porfiria eritropoyética congénita [357]. Este modelo, denominado TgURO, al igual que ocurre a lo largo de la enfermedad en humanos [348], está caracterizado principalmente por la producción de altas concentraciones de URO I en sangre de forma constante desde los primeros días de vida. Este hecho nos animó a utilizar este modelo como una novedosa aproximación para estudiar la actividad antiprónica de la URO I *in vivo*. Por ello, con el fin de conocer la variabilidad de los niveles de URO I en sangre y en el encéfalo que presentaban los animales homocigotos de este modelo [TgURO (HO)], las distintas muestras se procesaron de acuerdo con un protocolo de extracción de porfirinas y se determinaron las concentraciones de URO I mediante HPLC.



**Figura 16. Determinación de los niveles de uroporfirina I en encéfalo y sangre en modelos TgURO para corroborar su posible relación con el retraso en el desarrollo de enfermedad priónica.** Para relacionar los niveles de los TgURO (HE) (n=4) tanto en encéfalo como en sangre con los niveles de los TgURO (HO) (n=4), se analizó la concentración de URO I en ambos tejidos en los dos modelos. Se extrajo sangre por vía submandibular un día antes de la extracción del encéfalo. El encéfalo se extrajo, realizando previamente una perfusión exhaustiva del animal, para evitar cualquier contaminación con la sangre periférica dados los elevados niveles esperados respecto al encéfalo. Las muestras de sangre y encéfalo se procesaron para extraer la URO I presente y los niveles de URO I se cuantificaron mediante HPLC acoplado a un detector de fluorescencia analizando los datos con diferentes paquetes estadísticos. A) Se observa que los niveles de URO I presentes en el encéfalo de los animales TgURO (HE) están entre 0.2 y 1.10 µM, mientras que en los animales homocigotos están entre 0.7 y 1.6 µM, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p<0.05), corroborando que el retraso observado en el desarrollo de la enfermedad en el caso de los animales homocigotos se debe a la mayor concentración del compuesto en el encéfalo. B) En el caso de las muestras de sangre, los animales TgURO (HE) presentan unos niveles 0 - 9.3 µM, mientras que en los homocigotos esta concentración asciende a 25.8 – 122.1 µM, existiendo también una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (p<0.05) y validando los resultados de permeabilidad a la barrera hematoencefálica obtenidos mediante el modelo celular.

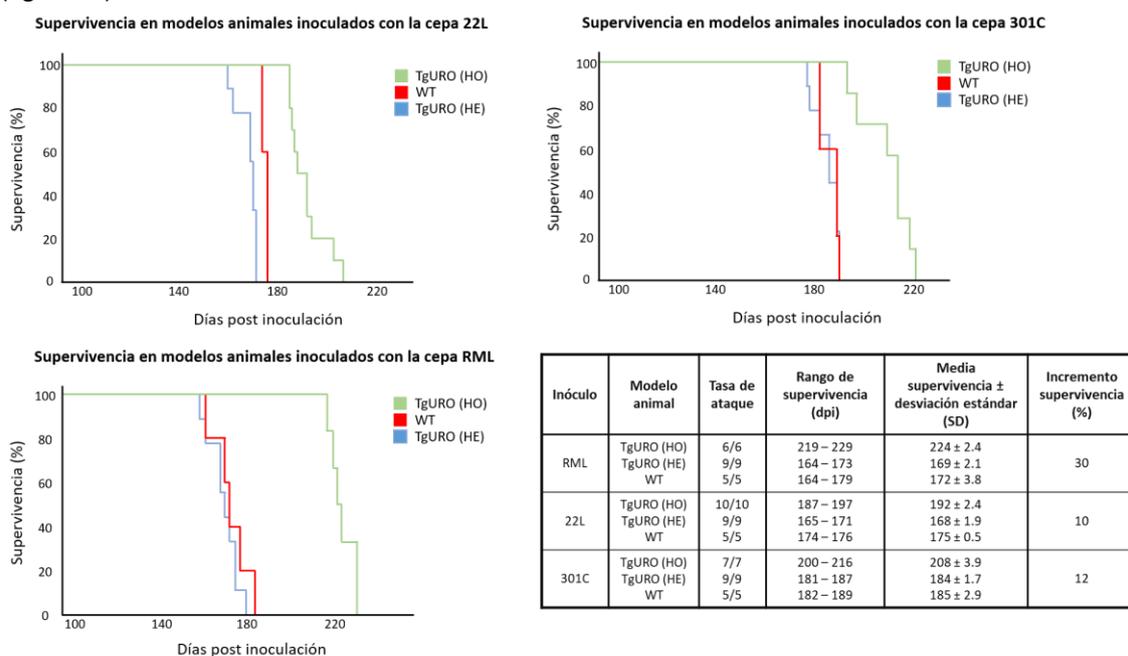
Los resultados obtenidos muestran una significativa variabilidad interindividual, que oscila entre 25 - 120 µM de URO I en sangre y 0.7 – 1.60 µM en el encéfalo (figura 15). Tal y como se había descrito previamente, los niveles de URO I en los animales TgURO heterocigotos [TgURO (HE)] fueron significativamente (p<0.05) inferiores y equivalentes a los niveles que muestran los animales de genotipo silvestre; 0 – 9.3 µM de URO I en sangre y 0.2 – 1.10 µM en el encéfalo. La concentración extraordinariamente alta y constante de URO I en sangre que mostró este modelo de enfermedad

porfírica nos animó a utilizarlo con el fin de evaluar el efecto que este metabolito natural presentaba sobre la progresión de diferentes tipos de enfermedades priónicas.

### 5.2 La uroporfirina I aumenta la supervivencia de los ratones infectados con diferentes cepas priónicas

Ante la demostración de que los animales TgURO (HO) mostraban niveles de URO I extraordinariamente altos en sangre que correlacionaban con niveles aproximadamente 50 veces inferiores en el encéfalo, pero de forma mantenida en el tiempo, se inocularon intracerebralmente con tres cepas priónicas murinas ampliamente caracterizadas: 22L, RML y 301C. Animales TgURO (HE) y ratones *wild-type* del mismo genotipo que expresaban niveles basales de URO I se inocularon con las mismas cepas priónicas como control del experimento.

Tras la inoculación, el estado de los animales se monitorizó para la detección de signos clínicos, sacrificándose aquellos animales que mostraban signos característicos de la enfermedad. Los datos de supervivencia se analizaron utilizando un programa estadístico para evaluar su significancia estadística (figura 17).



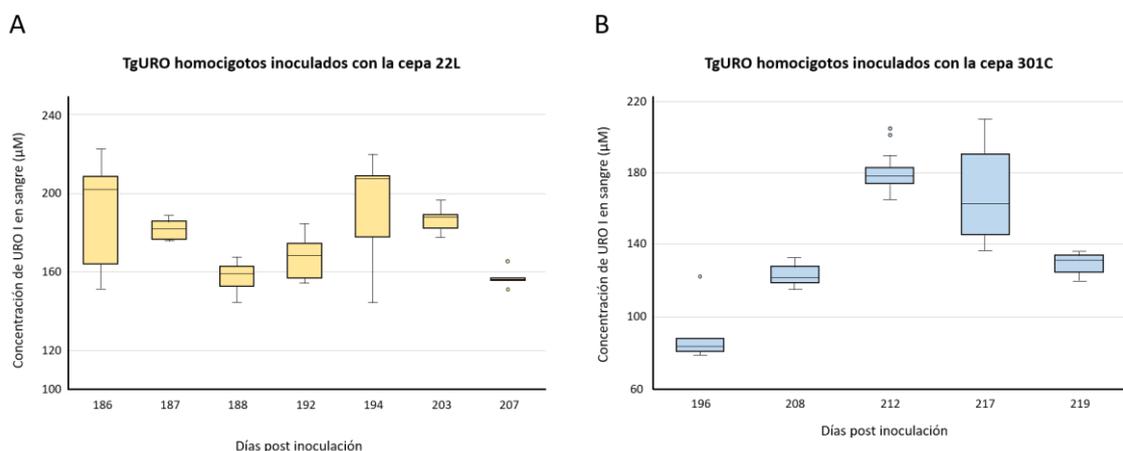
**Figura 17. Estudio de supervivencia de los modelos animales TgURO homocigotos, heterocigotos y ratones de genotipo silvestre inoculados con diferentes cepas murinas.** Para testar el efecto inhibitor de la URO I, se inocularon los modelos animales TgURO (HO) y (HE) y ratones *wild-type* (WT) con diferentes cepas murinas. Los animales fueron anestesiados e inoculados intracerebralmente con las cepas 22L, RML y 301C al 1%. Los animales se observaron diariamente hasta la aparición de los primeros signos neurológicos, momento en el que se sacrificaron y se les extrajo sangre, encéfalo y bazo. La figura muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para cada uno de los inóculos utilizadas con los animales WT en verde, TgURO (HO) en rojo y TgURO (HE) en azul. Los valores de supervivencia, las tasas de ataque y los cálculos de incremento de supervivencia se muestran en la tabla que acompaña las gráficas. Los TgURO (HO) inoculados con la cepa RML son los que muestran un mayor incremento de la supervivencia de hasta un 30 % respecto a los WT que, a su vez, no muestran diferencias significativas con respecto a los animales TgURO (HE). En los casos de las cepas 22L y 301C, los TgURO (HO) también presentaban mayor tiempo de supervivencia con un 10 y un 12 % respectivamente. En los tres casos la diferencia entre los animales TgURO (HO) y los otros modelos [animales WT y TgURO (HE)] es estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ). HE: Heterocigoto, HO: Homocigoto, WT: *wild-type*, dpi: días post-inoculación.

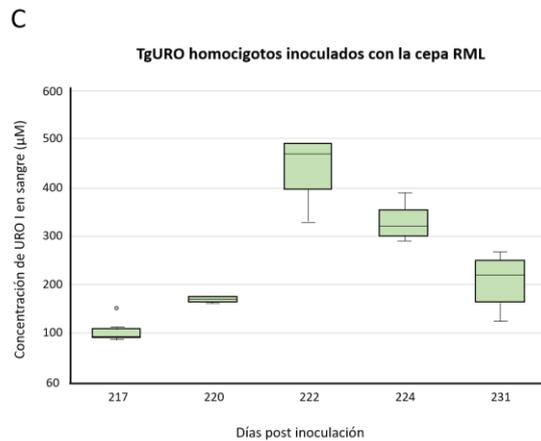
## RESULTADOS

En la tabla se observa una tasa de ataque para las tres cepas del 100 % en todos los grupos de animales. En el caso de la cepa 301C, los animales control TgURO (HE) mostraron tiempos de incubación medios de 184 días post inoculación (dpi)  $\pm$  1.7 (desviación estándar), prácticamente idénticos al de los animales controles WT con 185 dpi  $\pm$  2.9. Por el contrario, los animales TgURO (HO) inoculados con esta cepa mostraron un retraso significativo de alrededor de 25 días (208 dpi  $\pm$  3.9). Cuando se utilizó la cepa 22L, se observó un tiempo medio de incubación de 168 dpi  $\pm$  1.9 en los animales control TgURO (HE), muy similar al de los animales control WT (175 dpi  $\pm$  0.5). De forma similar a lo ocurrido con la cepa anterior, los animales TgURO (HO) de nuevo mostraron un retraso de aproximadamente 20 días (192 dpi  $\pm$  2.4). Por último, los ratones inoculados con RML fueron los que mostraron una mayor diferencia entre grupos; los animales control de TgURO (HE) presentaron un tiempo de incubación medio de 169 dpi  $\pm$  2.1 similar al de los animales control WT de 172 dpi  $\pm$  3.8, mientras el grupo de animales TgURO (HO) sufrió un retraso de la enfermedad de aproximadamente 55 días, con un tiempo de incubación medio de 224 dpi  $\pm$  2.4, extraordinariamente alto para esta cepa murina. De acuerdo con el análisis estadístico (prueba de Mantel-Cox), no hay diferencias significativas en los tiempos de supervivencia de los animales control WT respecto a los animales control TgURO (HE), sugiriendo que el efecto antipriónico mostrado por los animales TgURO (HO) únicamente está mediado por los niveles sistémicos de URO I y no por la mutación en la UROIIIS que también la presentan los animales TgURO (HE). Todos los animales TgURO (HO), independientemente de la cepa utilizada, mostraron un retraso estadísticamente significativo en la aparición de signos clínicos respecto a sus controles (Mantel – Cox con un valor de  $p < 0.05$ ).

### 5.3 Los niveles de uroporfirina I se correlacionan con el retraso en el desarrollo de signos clínicos

Tras la observación de un retraso significativo en el desarrollo de la enfermedad priónica inducida utilizando 3 tipos de cepas priónicas, se quiso verificar si los tiempos de supervivencia individuales para cada uno de los animales inoculados correlacionaban con los niveles de URO I en sangre (y presumiblemente en el encéfalo) que presentaban los animales en el momento de su sacrificio. Para ello, las muestras sanguíneas de los animales TgURO (HO) se procesaron de acuerdo con un protocolo de extracción de porfirinas y se determinó la concentración de URO I mediante HPLC, sometiendo los datos a análisis con diferentes paquetes estadísticos (figura 18).





**Figura 18. Cuantificación de los niveles de uroporfirina I en sangre del modelo TgURO homocigoto y su relación con el retraso del desarrollo de la enfermedad causada por diferentes cepas priónicas.** Para verificar si los animales del modelo murino TgURO (HO) que presentaban un mayor retraso en el desarrollo de la enfermedad tenían también unos niveles más elevados de URO I, se midieron los niveles de este compuesto en sangre y se compararon con los datos de supervivencia. La extracción de sangre se realizó en el momento del sacrificio de forma intracardiaca y se procesó para la extracción de URO I. Los niveles de URO I se cuantificaron mediante HPLC acoplado a fluorescencia y los resultados se sometieron a análisis estadístico. A) En los animales inoculados con la cepa 22L no se observa ninguna correlación entre los niveles de URO I y el retraso en el desarrollo de la enfermedad de cada animal ( $p>0.05$ ). B) En los modelos inoculados con la cepa 301C se observa cierta tendencia lineal ( $R=0.44$ ,  $p<0.05$ ) positiva que sugeriría una correlación directa entre los niveles de URO I y una mayor supervivencia. C) También en los animales inoculados con la cepa RML se observa una tendencia lineal positiva ( $R=0.4$ ,  $p<0.05$ ) que relacionaría un mayor retraso de la enfermedad con unos mayores niveles de URO I.

En la figura 18 se muestra como los animales TgURO (HO) presentan unos niveles de URO I en sangre de entre  $79 \mu\text{M}$  y  $491 \mu\text{M}$  con una media de  $186 \pm 80 \mu\text{M}$ , reflejando la variabilidad esperada de los niveles sistémicos de URO I. Con el fin de establecer una correlación entre el retraso en la aparición de la enfermedad para cada una de las cepas priónicas utilizadas y los niveles en sangre de URO I presentes en los animales homocigotos, los valores obtenidos se agruparon acorde al tipo de inoculación. Los ratones TgURO (HO) inoculados con la cepa RML presentaron unos niveles de URO I que variaron entre  $86 \mu\text{M}$  y  $491 \mu\text{M}$  con una media de  $246 \mu\text{M} \pm 123$ , mientras que los animales inoculados con la cepa 22L mostraron concentraciones de URO I significativamente menores que oscilaron entre  $144 \mu\text{M}$  y  $223 \mu\text{M}$ , con una media de  $175 \mu\text{M} \pm 21$ . Por último, los animales inoculados con la cepa 301C presentaron concentraciones de URO I entre  $78 \mu\text{M}$  y  $210 \mu\text{M}$ , con una media de  $145 \mu\text{M} \pm 37$ . Estos resultados sugieren que, con alguna excepción y al menos para los ratones inoculados con las cepas RML y 301C, existe una correlación entre la magnitud del retraso en la enfermedad y la concentración de URO I en sangre que presentaban los animales al día del sacrificio.

#### 5.4 Los patrones de las lesiones espongiiformes y la distribución de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> no muestran diferencias entre el modelo de enfermedad y el modelo silvestre

Con el objetivo de verificar si la URO I podría haber modificado el curso de la enfermedad priónica modificando el patrón lesional y/o la cantidad y distribución de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup>, más allá de causar un retraso en la aparición de los signos clínicos, se realizó un estudio inmunohistopatológico de los

## RESULTADOS

encéfalos de los animales TgURO (HO) y TgURO (HE) inoculados con las cepas murinas RML, 22L y 301C. Dado que todos los animales se sacrificaron en una fase similar de la enfermedad, independientemente de los tiempos de incubación que mostraran, se estudió en detalle su perfil lesional con el fin de poder detectar también si había habido una modificación de las propiedades de cepa. En este estudio se evaluó la localización y el tipo de espongiosis tras la tinción de los encéfalos fijados con hematoxilina-eosina, así como se realizó un análisis inmunohistoquímico utilizando el anticuerpo anti-PrP<sup>Sc</sup> 6C2, que permitió evaluar la presencia y el tipo de agregados de PrP<sup>Sc</sup> en el hipocampo, tálamo, corteza cerebelosa, cerebelo, cuerpo estriado y tronco encefálico (figura 19).

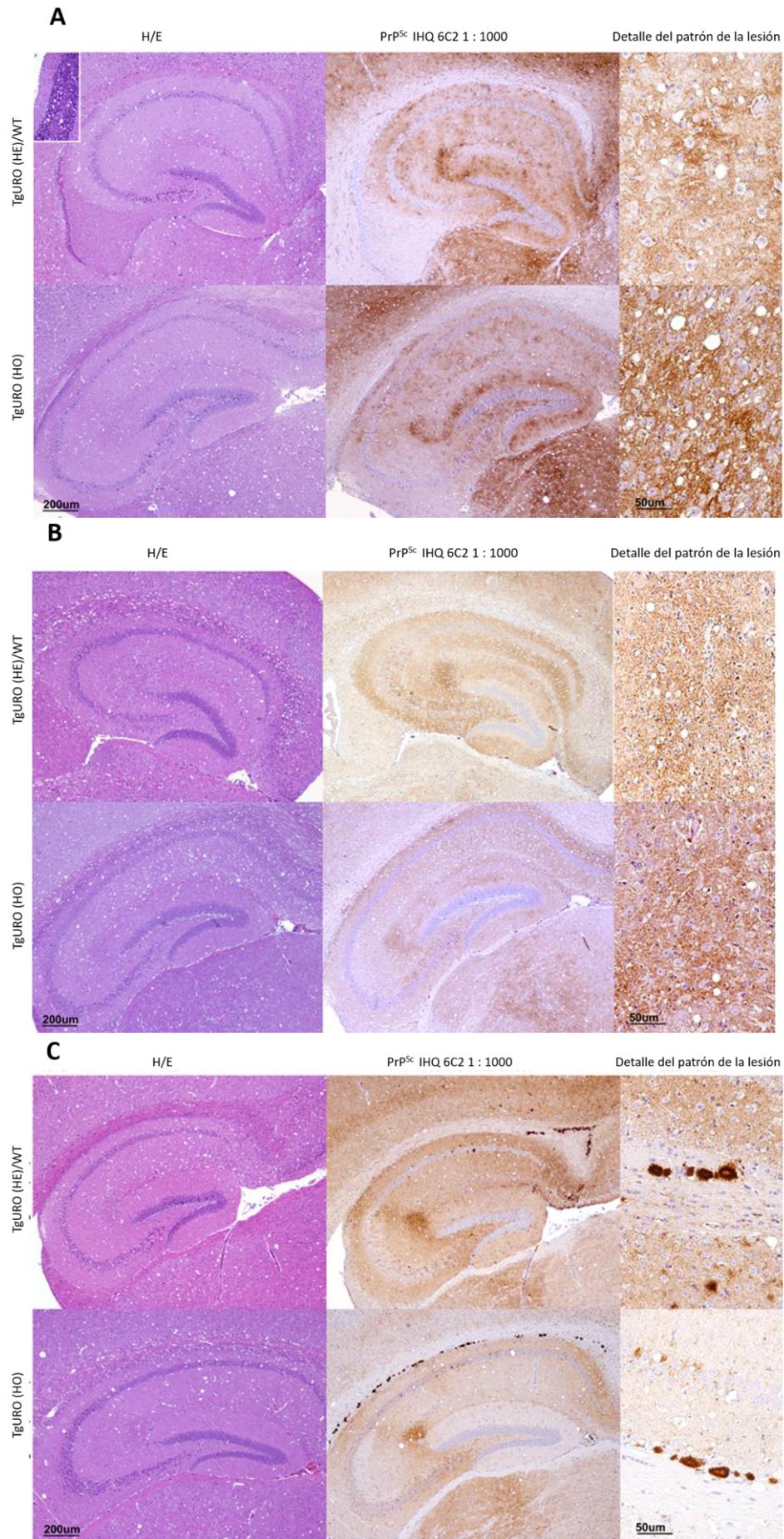
En los encéfalos de los animales TgURO (HO) y TgURO (HE) inoculados con RML se observa una espongiosis generalizada, pero especialmente intensa en los núcleos talámicos y la comisura anterior. Por el contrario, en el cerebelo, el cuerpo estriado y la medula oblongata se puede observar menos intensidad de lesión espongiiforme. El inmunomarcaje, que colocaliza con la espongiosis, muestra un patrón punteado fino de distribución difusa en las áreas estudiadas.

En el caso de los animales inoculados con la cepa 22L, independientemente del tipo de modelo utilizado, todos los encéfalos muestran el mismo patrón de lesiones. Este consta de una espongiosis moderada generalizada, que se torna muy intensa en la corteza cerebelosa y los núcleos laterales del tálamo. El patrón de inmunomarcaje se observa como un punteado fino, pero con áreas multifocales de mayor intensidad. Este marcaje es intenso en todo el encéfalo, con una menor intensidad en el cuerpo estriado y el hipocampo.

En el caso de las lesiones observadas en los encéfalos de los animales TgURO (HE) inoculados con la cepa 301C, se aprecia una espongiosis generalizada de mayor intensidad en el tronco encefálico, estando el cuerpo estriado y la corteza cerebelosa menos afectadas. Muestran también un inmunomarcaje de punteado fino junto con la presencia de placas redondeadas con el centro más claro en la sustancia blanca presente en el hipocampo y en el cuerpo caloso. Sin embargo, en los encéfalos de los animales TgURO (HO), a pesar de que las lesiones son muy parecidas, se aprecia un marcaje de PrP<sup>Sc</sup> de mayor intensidad, que podría deberse a un tiempo de incubación prolongado que presentaron estos animales.

Este estudio permite concluir que, más allá del retraso en la aparición de los signos característicos de la enfermedad y supervivencia observados en los animales TgURO (HO) comparativamente con los animales TgURO (HE), no se detectaron cambios en los estudios neurohistopatológicos, no apreciándose diferencias en el perfil de lesiones ni en los depósitos de PrP<sup>Sc</sup>. Por tanto, el compuesto no modifica el curso de la enfermedad ni modifica las características de las cepas originales.

# RESULTADOS



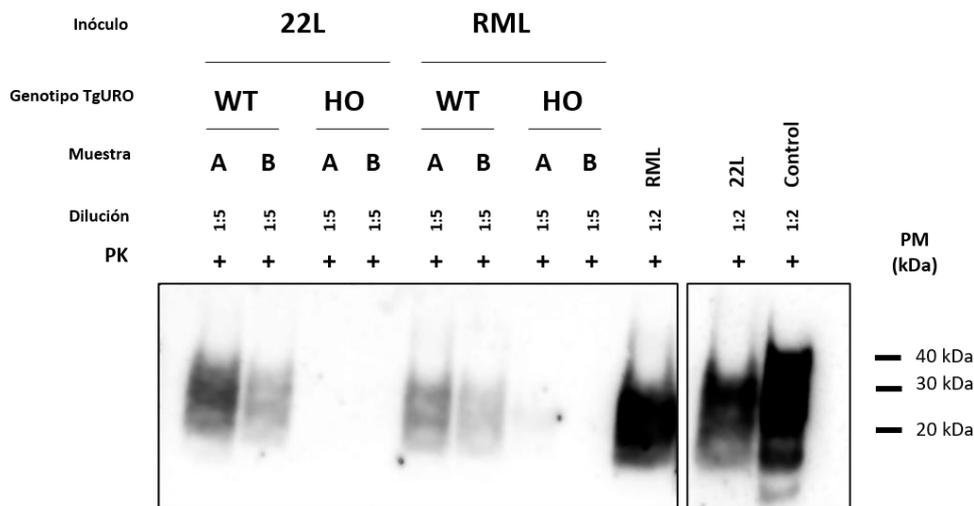
**Figura 19. Análisis histopatológico para evaluar la espongiosis y la presencia de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en los modelos TgURO homocigotos en comparación con los TgURO heterocigotos y ratones de genotipo silvestre inoculados con las diferentes cepas murinas.** Para determinar si existen cambios en el patrón de lesiones, los depósitos o distribución de PrP<sup>Sc</sup> y si estos podrían verse alterados por la presencia de URO I, se estudiaron las lesiones existentes en diferentes zonas del encéfalo de los modelos animales TgURO (HO) en comparación con los TgURO (HE) y los ratones de genotipo silvestre o *wild-type* (WT) infectados con las mismas tres cepas murinas. Los animales TgURO (HE) y WT se analizaron como un solo grupo al no mostrar diferencias significativas en cuanto a sus niveles de URO I sistémico. Los encéfalos previamente fijados en paraformaldehído y embebidos en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica para la detección de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> se realizó con el anticuerpo 6C2 (1:1 000). A) En las muestras de encéfalo de los animales inoculados con la cepa 22L no se observan diferencias entre los modelos TgURO (HO), (HE) y WT, observándose en todos los tejidos analizados una espongiosis moderada generalizada, más intensa en la corteza cerebelosa y los núcleos laterales del tálamo. También se aprecia un patrón de inmunomarcaje de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> fino pero intenso en casi todo el encéfalo. B) En las muestras de tejido de los animales inoculados con la cepa RML no se observan diferencias evidentes entre los TgURO (HO), (HE) y WT, observándose una espongiosis generalizada, especialmente intensa en la corteza anterior y los núcleos talámicos. También se ha descrito un inmunomarcaje generalizado de PrP<sup>Sc</sup> co-localizado con la espongiosis y con un patrón de punteado fino de distribución difusa. C) En las muestras de encéfalo pertenecientes a los modelos inoculados con la cepa 301C, tampoco se observan diferencias evidentes entre los TgURO (HE) y los WT, mostrando una espongiosis generalizada de mayor intensidad en el tronco encefálico y un marcateo de PrP<sup>Sc</sup> de punteado fino junto con la presencia de placas redondeadas con el centro más claro en sustancia blanca del hipocampo y cuerpo calloso. No obstante, en el caso de los TgURO (HO), aunque las lesiones observadas son muy similares, se puede apreciar una mayor intensidad en el marcateo con el anticuerpo 6C2, que podría indicar cierta alteración en la acumulación de PrP. H/E: Tinción hematoxilina – eosina, HE: Heterocigoto, HO: Homocigoto, IHQ: Inmunohistoquímica WT: *wild-type*.

### 5.5 La uroporfirina I interfiere con la diseminación de la PrP<sup>Sc</sup> hacia el bazo

Una de las características de determinadas cepas priónicas es su capacidad de diseminarse y propagarse a través del sistema linforeticular [370]. Para comprobar si la presencia de altas concentraciones de URO I en sangre podría haber alterado la capacidad de diseminación periférica de la PrP<sup>Sc</sup>, se estudiaron los bazos de los animales TgURO (HO) y (HE) inoculados con las cepas priónicas murinas 22L, 301C y RML con el fin de determinar la presencia o ausencia de PrP<sup>Sc</sup> en dicho órgano. Para ello, se purificó la PrP<sup>Sc</sup> presente en el bazo de una muestra representativa de animales TgURO (HO) y (HE) del estudio previo. Dada la reducida propagación que estas cepas priónicas presentan en los tejidos linforeticulares y a la baja sensibilidad de las técnicas bioquímicas para detectar directamente PrP<sup>Sc</sup>, se recurrió a la amplificación de las muestras purificadas mediante la técnica de amplificación cíclica de proteínas malplegadas (PMCA). La PrP<sup>Sc</sup> purificada a partir de los bazos se utilizó como semilla que se sometió a una ronda de PMCA de 48 h, y cuyo producto resultante se digirió con PK y se observó por *Western blot* (figura 20).

En la figura 20 se muestra cómo únicamente se detectó PrP<sup>Sc</sup> por PMCA en aquellos bazos que provenían de animales TgURO (HE) inoculados con las cepas priónicas RML y 22L. La ausencia de detección de PrP<sup>Sc</sup> en bazos de ratones TgURO (HE) inoculados con la cepa 310C podría explicarse dado que la diseminación periférica de esta cepa parece menor [371]. Por otro lado, en ninguno de los bazos estudiados que provenían de animales TgURO (HO) inoculados con alguna de las tres cepas priónicas se detectó la

presencia de PrP<sup>Sc</sup>. Estos resultados sugieren que la presencia de URO I en sangre ha reducido significativamente la propagación periférica de los priones inoculados intracerebralmente.



**Figura 20. Estudio de la capacidad de la uroporfirina I de inhibir la dispersión de la PrP<sup>Sc</sup>.** Se quiso estudiar si la presencia de altos niveles sistémicos de URO I disminuía o detenía la dispersión y propagación de priones en el sistema linforeticular, principalmente en el bazo. Este órgano se extrajo de los animales tras su sacrificio y se procesó para purificar y concentrar los agregados de PrP<sup>Sc</sup> que pudiera contener para su posterior detección mediante propagación *in vitro*. Así, Con la PrP<sup>Sc</sup> purificada, se realizó una ronda de PMCA de 48 h en un sustrato de homogeneizado de encéfalo de ratón WT, el producto resultante se digirió con PK y se analizó por *Western blot* utilizando Saf 83 (1:400) como anticuerpo. Se puede observar cómo en las muestras de bazo de los animales WT inoculados con la cepa 22L y RML, se aprecia propagación priónica, indicando la presencia de priones en el sistema linforeticular. Por el contrario, esta no existe en los modelos homocigotos, sugiriendo que la URO I también limita la propagación de priones fuera del sistema nervioso. PM: Peso molecular, PK: Proteínasa K. HO: Homocigoto, WT: *wild-type*.

## 6 La uroporfirina I causa un retraso en la manifestación de los signos clínicos en el modelo animal de enfermedad priónica espontánea

A raíz de los experimentos anteriores, se puede concluir que la URO I presente en sangre en una alta concentración de forma continuada retrasa de forma significativa la aparición de una enfermedad priónica inducida mediante la inoculación intracerebral de al menos tres cepas priónicas murinas. Sin embargo, dentro de las EET que afectan a humanos, las que representan el 85 % de los casos totales diagnosticados, son enfermedades esporádicas con un origen espontáneo putativo. Por esta razón, y con el fin de evaluar la actividad antipriónica de la URO I en el contexto de una enfermedad que se desarrolla de forma espontánea en el SNC, se generó un nuevo modelo animal de enfermedad priónica espontánea que produjera altas concentraciones de URO I en sangre de forma persistente.

### 6.1 Generación de un modelo animal de enfermedad priónica espontánea

En 2010, el laboratorio generó el primer modelo transgénico que espontáneamente desarrollaba una enfermedad priónica *bona fide* (TgVole 4x). Este modelo animal está sirviendo para comprender mejor los mecanismos por los que se rige la generación espontánea de proteínas malplegadas y para testar compuestos con potencial actividad antipriónica. La ventaja de ser un modelo de enfermedad espontánea

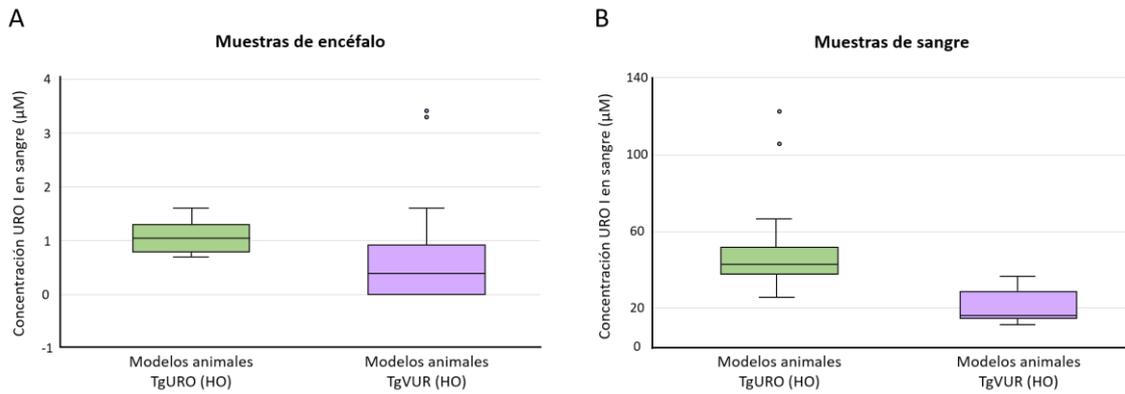
## RESULTADOS

lo hace idóneo para estudiar compuestos con potencial terapéutico frente a enfermedades priónicas genéticas que se desarrollarán de forma espontánea en algún momento de la vida del individuo.

Desafortunadamente, los estudios farmacocinéticos previos demostraron la imposibilidad de administrar exógenamente URO I con el fin de conseguir altas concentraciones en sangre de este compuesto de forma continuada. Sin embargo, los resultados mostrados previamente con el modelo animal TgURO (HO) sugirieron el cruzamiento de ambos modelos para conseguir un nuevo y único modelo animal de enfermedad priónica espontánea que produjera grandes cantidades de URO I en la sangre de manera persistente. Para conseguir este nuevo modelo animal se realizó un programa de cruces en dos fases. La primera fase de los cruces tenía como objetivo eliminar el gen que codifica la PrP endógena de ratón presente en los animales TgURO (HO), para posteriormente seleccionar aquellos animales que hubieran incorporado además el gen que codifica la PrP del topillo rojo y que sobreexpresa 4x esta proteína. Para ello, se cruzaron animales TgURO (HO) con ratones transgénicos *knock-out* para la PrP (KO-PrP o ratónPrP<sup>-/-</sup>), dando lugar a animales con las siguientes características que fueron seleccionados: no poseían la PrP endógena (ratónPrP<sup>-/-</sup>) y expresaban el gen mutado de la UROIIIS en homocigosis (URO<sup>+/+</sup>). Para la segunda fase, estos animales se cruzaron con animales TgVole 4x, con el objetivo de incorporar la PrP del topillo rojo. Tras un total de 5 cruces, se obtuvieron animales denominados TgVUR (HO) (ratónPrP<sup>-/-</sup>, volePrP<sup>-/+</sup> y URO<sup>+/+</sup>).

Con el fin de estudiar los niveles de URO I que producían de forma constitutiva los animales del nuevo modelo TgVUR (HO), se analizó la sangre y el encéfalo de estos animales y se comparó con las mismas muestras extraídas de animales del modelo TgURO (HO) del mismo rango de edad. Para la obtención de muestras de encéfalo de los animales de ambos modelos, se efectuó una perfusión más minuciosa para evitar contaminaciones con la sangre periférica. La extracción de URO I de las muestras de sangre y encéfalo se realizó de acuerdo con un protocolo de extracción de porfirinas y se midió mediante HPLC (figura 21).

En la figura 21 se observa que en los animales TgVUR (HO), los niveles de URO I presentes en la sangre oscilan entre 11.6 – 36.4  $\mu\text{M}$  y en el encéfalo entre 0 – 3.4  $\mu\text{M}$ . Los valores en sangre son alrededor de 10 veces inferiores a los observados con el mismo tipo de muestras procedentes de animales TgURO (HO). Mientras que los valores en el encéfalo son muy similares en los animales de ambos modelos. En ambos casos son estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ). Estos resultados sugirieron que la concentración de URO I, fundamentalmente en el encéfalo, podría ser lo suficientemente alta como para estudiar su efecto sobre la propagación priónica *in vivo*.

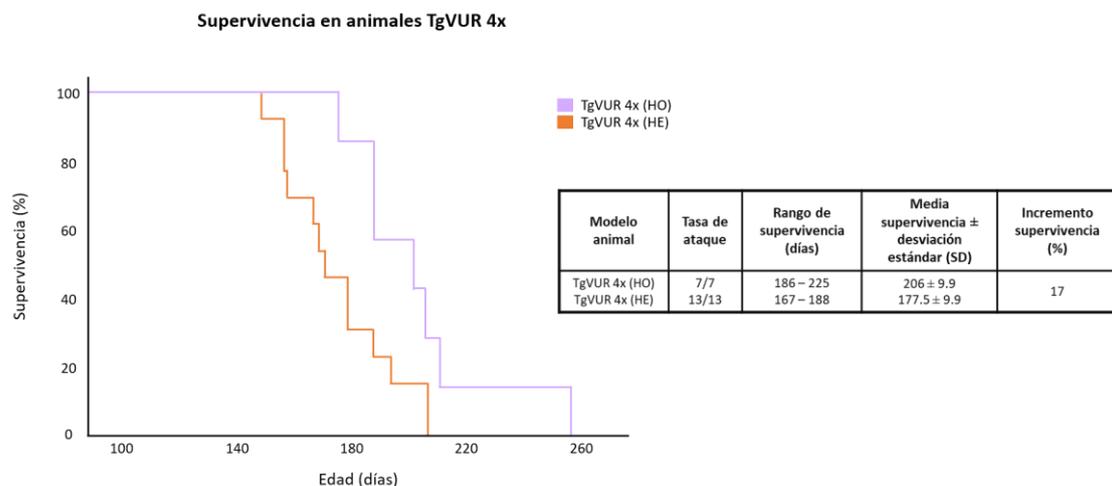


**Figura 21. Determinación de los niveles de uroporfirina I presentes en encéfalo y sangre en los modelos TgVUR y TgURO homocigotos.** Se compararon los niveles de URO I presentes en encéfalo y en sangre de los modelos animales TgURO (HO) y TgVUR (HO) para establecer si existen diferencias entre ellas. Se seleccionó una muestra de animales TgVUR (HO) (n=3) y TgURO (HO) (n=4), se extrajo sangre por vía submandibular y se realizó una perfusión exhaustiva del encéfalo para eliminar cualquier resto de sangre. Ambos se procesaron con el objetivo de extraer la URO I presente en los tejidos. Los niveles de URO I se cuantificaron por HPLC acoplado a fluorescencia y se procesaron con el programa estadístico SPSS. A) El nivel de URO I en las muestras de encéfalo de los animales TgURO (HO) es de 0.7 – 1.6 µM, mientras que en los TgVUR (HO) es de 0 – 3.4 µM. B) En las muestras de sangre de los animales TgURO (HO) la concentración de URO I es de 25.8 – 122.1 µM y en los animales TgVUR (HO) de 11.6 – 36.4 µM. En la gráfica se puede apreciar que, a pesar de las diferencias existentes en los niveles de URO I entre ambos modelos animales ( $p < 0.05$ ) tanto en sangre como en encéfalo, los niveles del compuesto son lo suficientemente altos en encéfalo para ralentizar la propagación priónica y aumentar la supervivencia *in vivo*.

**6.2 La La uroporfirina I retrasa los signos clínicos en el modelo de enfermedad espontánea**

Para estudiar si la presencia de URO I en sangre de forma continuada modificaba el momento de aparición de la enfermedad priónica espontánea, se seleccionaron 7 animales TgVUR 4x (HO) y 13 animales TgVUR 4x (HE) (mismo genotipo que los TgVUR 4x (HO) que no expresaban URO I) que actuaron como control. El inicio de la enfermedad espontánea en los animales de ambos modelos se monitorizó de forma continua para detectar los primeros signos clínicos. Se realizó un análisis estadístico de los datos utilizando la prueba de supervivencia de Kaplan-Meier.

En la figura 22 se muestra como la supervivencia de los animales TgVUR 4x (HO) varió entre los 186 y los 225 días con una media de  $206 \pm 9.9$  días, en comparación con los TgVUR 4x (HE) donde el rango de supervivencia osciló entre 167 y 188 días con una media de  $177.5 \pm 5.3$  días. Estos datos indican que los



**Figura 22. Estudio de la supervivencia de los modelos TgVUR 4x homocigoto y heterocigoto como modelos de enfermedad priónica esporádica.** Para determinar si niveles elevados de URO I podrían también incrementar la supervivencia en el caso de las enfermedades priónicas esporádicas, se evaluó el desarrollo de la misma en los modelos animales TgVUR 4x (HO), con niveles elevados de URO I, y heterocigoto, que muestra niveles de URO I equivalentes a un animal de genotipo silvestre. Se utilizó una n=7 para los TgVUR 4x (HO) y una n=13 para los TgVUR 4x (HE). Los animales se observaron diariamente hasta la aparición de los primeros signos clínicos, cuando se sacrificaron. En los modelos animales TgVUR 4x (HO) el tiempo medio de supervivencia fue de  $206 \pm 9.9$  días, mientras que en los TgVUR 4x (HE) fue de  $177.5 \pm 5.3$  días, una diferencia es significativa ( $p < 0.05$ ) que sugiere que niveles elevados de URO I también retrasan el desarrollo de esta enfermedad priónica esporádica. HE: Heterocigoto, HO: Homocigoto.

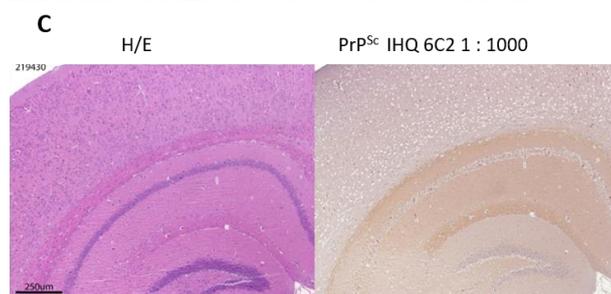
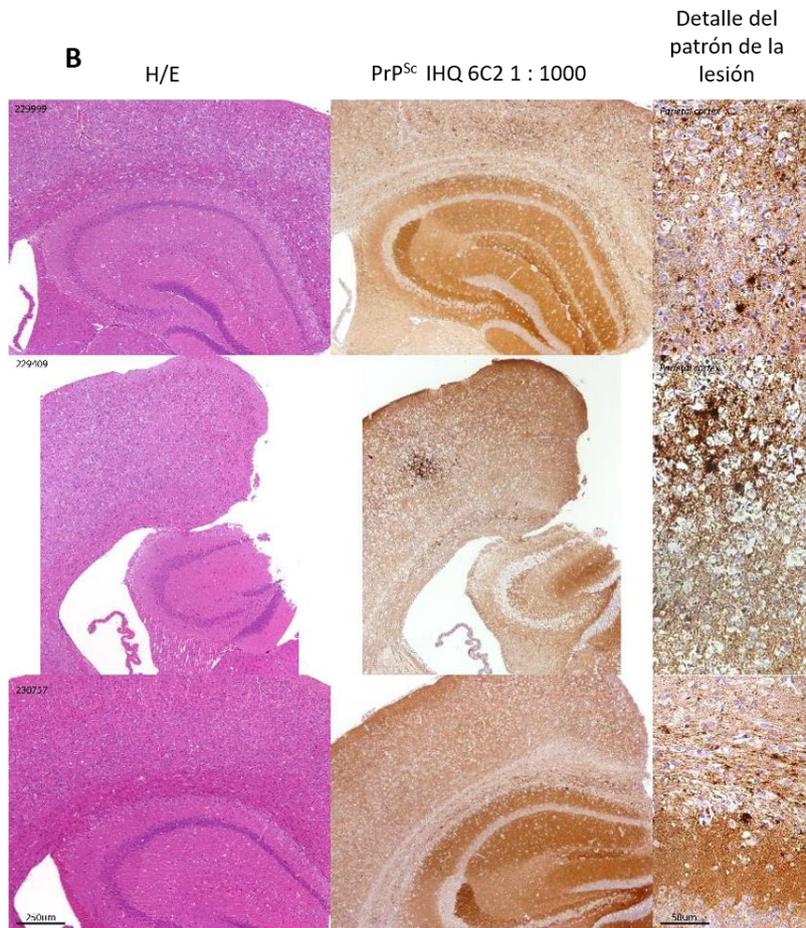
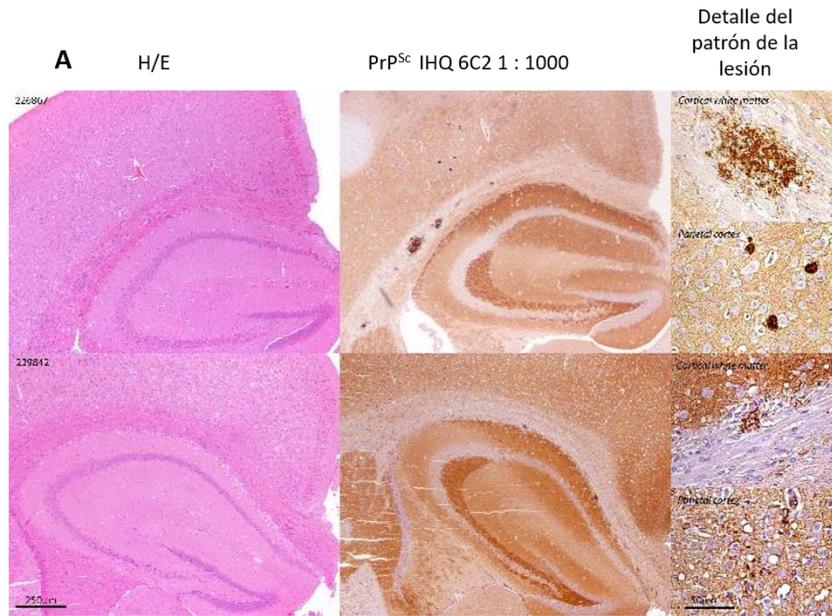
animales TgVUR 4x (HO) experimentaron un retraso de los signos clínicos muy significativo de un 17 % respecto al mostrado por los animales TgVUR 4x (HE), siendo esta diferencia estadísticamente significativa con una  $p < 0.05$  según la prueba de Mantel - Cox.

### **6.3 Los patrones de lesiones y depósitos de PrP<sup>Sc</sup> no muestran diferencias entre TgVUR 4x homocigotos y heterocigotos**

Con el objetivo de verificar si la URO I podría haber modificado el curso de la enfermedad priónica modificando el patrón lesional y/o la cantidad y distribución de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup>, se realizó un estudio inmunohistopatológico de los encéfalos de animales TgVUR 4x (HO) y (HE) y TgVole 4x, pertenecientes a otro estudio, que habían desarrollado una enfermedad priónica espontánea.

Dado que todos los animales se sacrificaron en una fase similar de la enfermedad, independientemente del tiempo de aparición espontánea que mostraran, se estudió en detalle su perfil lesional con el fin de determinar si había habido una modificación de las propiedades de cepa. Los resultados muestran que en general los animales TgVUR 4x (HO) y (HE) presentan una alta variabilidad en relación a las lesiones que se observan (figura 23). En algunas muestras pertenecientes a los animales TgVUR 4x (HO) y (HE) no se observan ni lesiones espongiiformes ni depósitos, mientras en otras sí que se evidencia una espongiosis y una gliosis focalizada en la corteza parietal afectando a capas profundas e intermedias del córtex, extendiéndose en los más graves hacia la corteza frontal y temporal e hipocampo. En los modelos TgVUR 4x (HO) y (HE) los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> se caracterizan por presentar un patrón punteado a granular, coalescente en algún punto y con cierta frecuencia muestran agregados más grandes situados a nivel de la sustancia blanca cortical de diferentes tamaños. En el caso de los animales TgVole 4x se observa una espongiosis más extensa y generalizada por toda la corteza parietal, aunque también se ven afectadas el resto de las cortezas: temporal, frontal y occipital. También se observa una lesión clara en el tálamo (núcleos laterales y ventrales) y en el hipocampo, especialmente, en la sustancia blanca. Los depósitos de PrP<sup>Sc</sup> de tipo punteado a granular, coalescente en algún punto de la corteza, no se observan en el grupo TgVUR 4x (HO), ni pudieron detectarse agregados en sustancia blanca tan claros como en el grupo anterior.

# RESULTADOS



**Figura 23. Análisis histopatológico para evaluar la espongiosis y la presencia de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en los modelos TgVUR 4x homocigotos y heterocigotos en relación con el modelo TgVole 4x.** Para determinar si existen cambios en el patrón de lesiones, los depósitos o distribución de PrP<sup>Sc</sup> y si estos podrían verse alterados por la presencia de URO I, se estudiaron las lesiones existentes en diferentes zonas del encéfalo de los modelos murinos TgVUR 4x (HO) y (HE) para el gen de la uroporfirinógeno 3 sintasa. En el estudio se compararon 5 animales TgVUR 4x (HO) y 11 animales TgVUR 4x (HE). Como control positivo se analizaron 6 animales TgVole 4x, y como control negativo 13 cerebros sanos (extraídos antes del desarrollo de la enfermedad priónica) de TgVUR 4x (HO). Los encéfalos previamente fijados en paraformaldehído y embebidos en parafina, se tiñeron con hematoxilina-eosina y la inmunohistoquímica se realizó con el anticuerpo 6C2 (1:1 000). A) No se observan diferencias entre los animales TgVUR 4x (HO) y TgVUR 4x (HE), existiendo una amplia variabilidad entre individuos. En ambos se aprecian espongiosis y gliosis focalizada en la corteza parietal afectando capas profundas e intermedias del córtex. En los casos más llamativos la espongiosis y gliosis se extienden a las cortezas frontal y temporal e hipocampo. También existen depósitos de PrP<sup>Sc</sup> con patrón punteado a granular y coalescente en algún punto. Con cierta frecuencia se observan agregados más grandes situados a nivel de la sustancia blanca cortical. B) En los tejidos encefálicos de los animales TgVole 4x, también existe cierta variabilidad, con las lesiones espongiiformes más extendidas a todas las capas de la corteza y varios lóbulos corticales, siendo el parietal el más afectado junto con el tálamo (núcleos ventrolaterales) que aparece habitualmente afectado. El patrón de PrP<sup>Sc</sup> es granular con áreas en las que coalesce. Estas áreas no se observan en los animales TgVUR 4x (HO) ni en los TgVUR 4x (HE). En este grupo control tampoco se observan los agregados en sustancia blanca cortical, aunque sí un patrón granular, en contraste con los modelos TgVUR.4x C) Los controles negativos que consisten en encéfalos sanos de TgVUR 4x (HO), no se encuentra ninguna lesión ni marcaje de PrP<sup>Sc</sup>. H/E: Tinción hematoxilina – eosina, HE: Heterocigoto, HO: Homocigoto, IHQ: Inmunohistoquímica.

### **7 Una mínima cantidad de uroporfirina I en el encéfalo es necesaria para detener la propagación priónica.**

La presencia en sangre de altas concentraciones de URO I en los animales pertenecientes a distintos modelos murinos ha demostrado que ralentiza significativamente la aparición de los signos clínicos y, con ello, aumenta la supervivencia tras la inoculación intracerebral con distintas cepas priónicas. Por otro lado, el URO I en sangre parece evitar la diseminación de los priones hacia el bazo, uno de los principales órganos linforeticulares donde ocurre la propagación priónica. Estos resultados se han conseguido gracias a que se disponía de un modelo animal que, de forma constitutiva, genera grandes cantidades del metabolito natural con actividad antipriónica. Sin embargo, también sabemos que dadas las características farmacocinéticas de este compuesto estas condiciones no se pueden conseguir tras una simple inoculación exógena del compuesto, aunque esta sea de forma continuada. Por otro lado, sabemos que los ratones TgVUR (HO) logran generar estas cantidades enormes de URO I como consecuencia de una alteración en la enzima UROIII S que interviene en el metabolismo del grupo heme. Dado que el 85 % de este metabolito natural se produce en las células eritroides de la médula ósea de estos animales [372], diseñamos un estudio completo para aportar estas cantidades de URO I necesarias para el control de la enfermedad en modelos silvestres a través del trasplante de médulas óseas de animales TgVUR (HO) que actuaría a modo de potentes productoras del compuesto antipriónico. Esta estrategia se diseñó a modo de prueba de concepto para en un futuro desarrollarla como terapia frente a ETT humanas.

#### **7.1 Elección del modelo animal para la realización del trasplante de médula ósea y la infección priónica posterior**

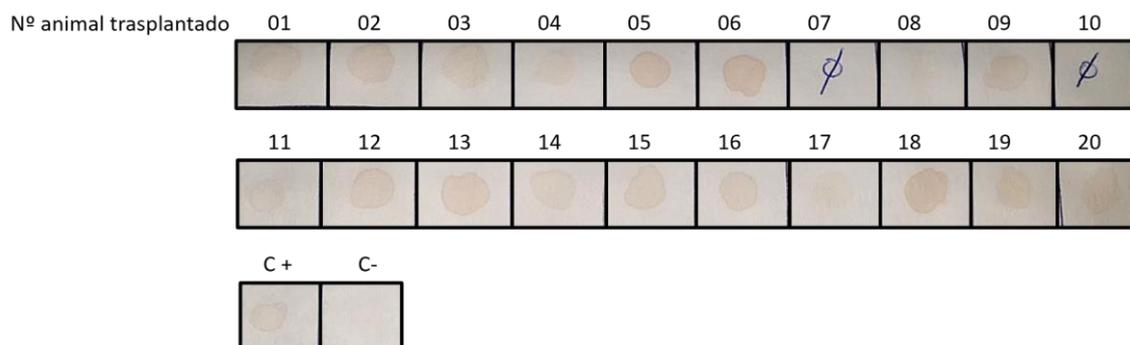
El modelo animal de elección debía de reunir dos características esenciales: 1) Ser un modelo (o modelos) animal que con el mismo fondo genético se dispusiera de individuos que produjeran grandes cantidades de URO I en sangre e individuos que no produjeran URO I en absoluto; 2) Ser un modelo altamente

susceptible a la infección por una cepa priónica que se propagara con rapidez en el SNC del animal dado que el trasplante y la presencia de altas concentraciones de URO I podrían limitar la edad media de estos animales. Por esta razón, se seleccionaron animales del modelo TgVole que expresan la PrP del topillo rojo de forma homocigota (volePrP<sup>+/+</sup>), y que son muy susceptibles a la infección por la cepa rápida CWD-Vole, para ser receptores de médulas óseas de animales del modelo TgVUR (HO), el modelo creado previamente tras el cruce de animales TgVole y animales TgURO (HO).

**7.2 El trasplante de médula ósea da lugar a la generación y acumulación de URO I en animales de genotipo silvestre**

Previa a la realización de un trasplante de médula ósea en ratones es necesario provocar una aplasia completa en la médula ósea del animal receptor. Una vez realizada esta, las células hematopoyéticas del animal donante se inoculan por vía intravenosa con el fin de que estas se injerten y reconstituyan la médula con las células trasplantadas.

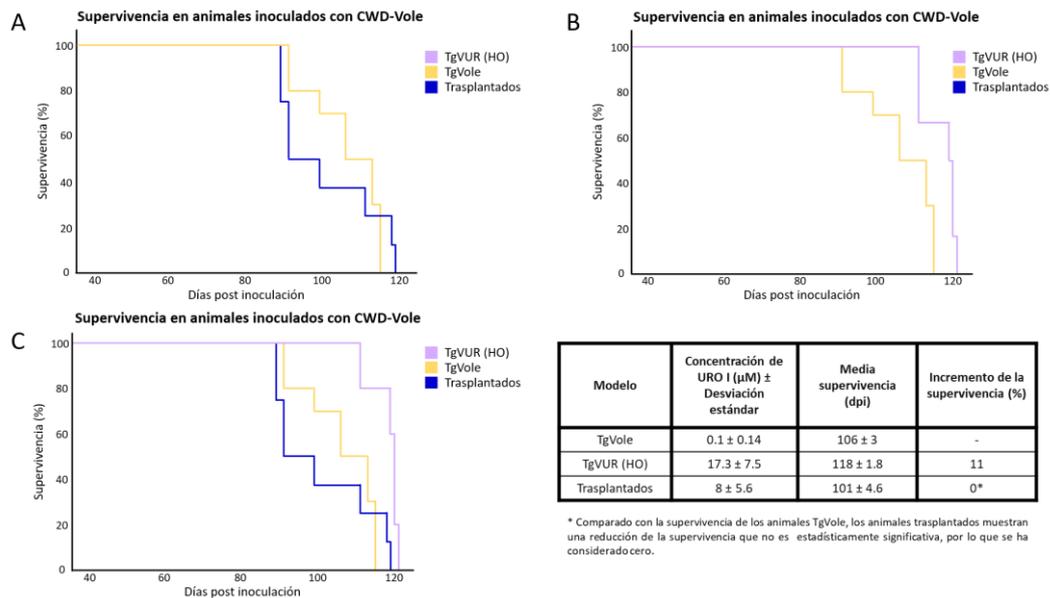
En este estudio se realizó un total de 20 trasplantes en animales TgVole a partir de un total de 4 médulas óseas de animales TgVUR (HO). La inducción de la aplasia en estos animales se realizó 24 h antes del trasplante. Se extrajo una media de ~60 millones de células hematopoyéticas de cada animal TgVUR (HO) donante que se trasplantaron por vía intravenosa a través del seno retroorbital en los 20 animales TgVole receptores. Tras el período de recuperación y total integración del injerto (10 días aproximadamente) y dado que el estado de salud de los animales recién trasplantados es frágil, el éxito del trasplante se evaluó mediante la observación directa de la coloración de la orina de los animales trasplantados. Esto fue posible gracias a la extraordinaria capacidad que tiene este metabolito natural de colorear de rojo la orina cuando es excretado. De los 20 trasplantes realizados, 18 fueron exitosos dado que los animales trasplantados mostraron la coloración rojiza en orina (figura 24).



**Figura 24. Evaluación de la presencia de niveles de uroporfirina I en los animales TgVole trasplantados.** Para determinar el éxito del trasplante de médula ósea, se monitorizó la orina de los 20 animales TgVole receptores de las células hematopoyéticas de los TgVUR (HO). El adecuado arraigo de las células trasplantadas debería reflejarse en la producción de altos niveles de URO I, que al ser excretado en la orina le confiere a esta una coloración rojiza. Utilizando la orina de un animal TgVUR (HO) como control positivo (C+) y la de un TgVole no trasplantado como control negativo (C-), se evaluó el color de 5 µl de orina de los animales trasplantados disponiéndolos sobre papel de filtro. Como puede verse en la imagen, a pesar de cierta variabilidad en la intensidad de la coloración rojiza, que sugiere niveles variables de URO I, en todos los animales se aprecia un tono rojizo similar al del control positivo indicando la producción y acumulación de niveles elevados del compuesto. De los animales 07 y 10, no pudo obtenerse orina ya que no sobrevivieron más de 10 días tras el trasplante. C+: Control positivo, C-: Control negativo.

**7.3 La concentración de URO I en la sangre de los animales trasplantados fue insuficiente para retrasar la aparición de la enfermedad priónica**

Los animales TgVole trasplantados se inocularon con la cepa priónica CWD-Vole, seleccionada por inducir una enfermedad priónica en el modelo TgVole con tiempos de incubación cortos, de entre 90 y 120 días. La inoculación se realizó intracerebralmente en un total de 8 animales que fueron controlados a través del mismo tipo de inoculación en 10 animales TgVole (animales altamente susceptibles a la infección) y 5 animales TgVUR (HO) (animales que producían cantidades de URO I que potencialmente retrasarían el desarrollo de la enfermedad priónica). El estado de los animales se monitorizó diariamente con el fin de detectar signos clínicos característicos de una enfermedad priónica. En el momento del sacrificio se obtuvieron muestras de sangre, cerebro y bazo, para su posterior estudio. Los datos de supervivencia se analizaron de forma estadística con la prueba de Kaplan-Meier, estableciendo un p valor significativo de  $p < 0.05$  (figura 25).



**Figura 25. Estudio de la supervivencia de los modelos animales TgVUR homocigotos, TgVole y TgVole trasplantados inoculados con una cepa priónica procedente de topillo rojo y su relación con los niveles de URO I detectados en sangre.** Con el objetivo de alcanzar niveles elevados de URO I, equivalentes a los animales TgURO (HO) o TgVUR (HO), en animales de genotipo silvestre respecto a la uroporfirinógeno sintasa, se realizó un trasplante de médula a animales TgVole proveniente de animales TgVUR (HO) de modo que la médula trasplantada produzca grandes cantidades de URO I. Para determinar si la URO I producida por la médula trasplantada podía inhibir la propagación priónica, se inocularon por vía intracerebral los modelos animales TgVUR (HO) (n=5), TgVole (n=10) y TgVole trasplantados (n=8) con la cepa CWD-Vole. Después, los animales se observaron diariamente hasta la aparición de los primeros signos clínicos, se sacrificaron y se les extrajo sangre, encéfalo y bazo. La figura muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier comparando los resultados observados en: A) los modelos TgVole respecto a los animales trasplantados, entre los que no se encuentran diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), ya que presentan periodos de supervivencia de  $106 \pm 3$  dpi y  $101 \pm 4.6$  dpi, respectivamente; B) los modelos TgVUR (HO) con un tiempo medio de supervivencia de  $118 \pm 1.8$  dpi, significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que el de los animales trasplantados; y finalmente, C) comparándose las curvas de supervivencia de los tres modelos utilizados puede apreciarse que los animales TgVUR (HO) son los únicos en los que se observa un aumento de la supervivencia. En la tabla que acompaña las gráficas de supervivencia se detallan las concentraciones medias de la URO I presentes en la sangre de los diferentes modelos en el momento del sacrificio. Las medidas realizadas por HPLC acoplado a fluorescencia revelan que los animales trasplantados presentan aproximadamente la mitad de URO I que los animales TgVUR (HO). Estos datos junto con los datos de supervivencia indican no pudieron alcanzarse niveles suficientes de URO I a través de los trasplantes como para incrementar la supervivencia. HO: Homocigoto, dpi: días post inoculación.

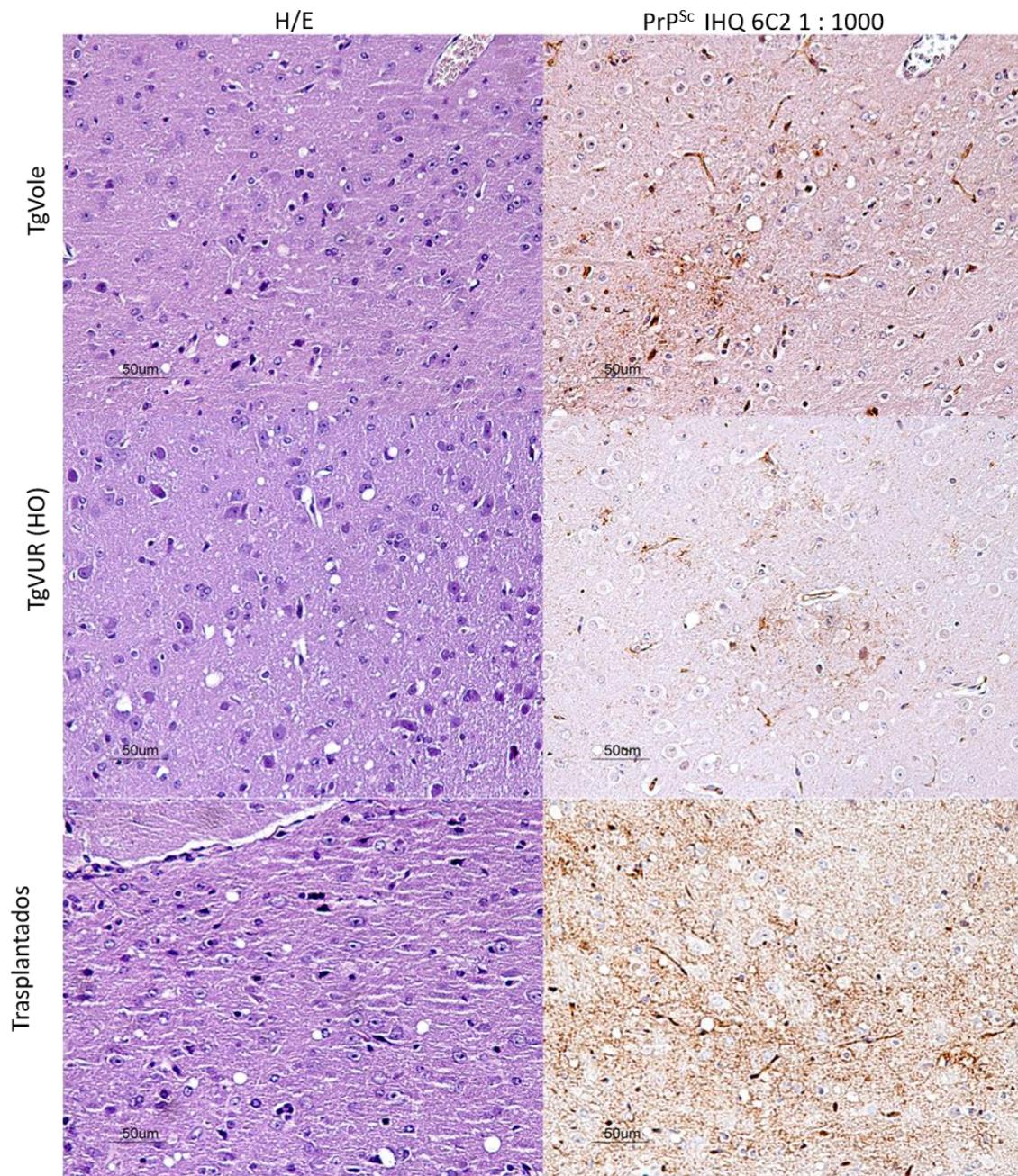
En la figura 25 se observa cómo los ratones TgVole mostraron un tiempo de incubación medio de 106 dpi  $\pm$  3 con un rango que va desde 100 hasta 112 dpi. Por el contrario, los animales del modelo TgVUR (HO) desarrollaron la enfermedad entre 114 y 122 dpi, con una media de 118 dpi  $\pm$  1.8. Estos tiempos de incubación reflejan que la presencia de la URO I en la sangre de estos animales promovió un retraso de los tiempos de incubación de la enfermedad del 11 % ( $p < 0.05$ ). Finalmente, los animales TgVole trasplantados presentaron tiempos de incubación entre 92 y 110 dpi con una media de 101 dpi  $\pm$  4.6, similar al mostrado por los animales TgVole. En la tabla se muestra una correlación entre la concentración media de URO I en la sangre de los animales inoculados obtenida en el momento del sacrificio y los tiempos de incubación resultantes tras su infección. Estos resultados sugieren que la ausencia de retraso en el desarrollo de la enfermedad priónica observada en los animales trasplantados es una consecuencia de que la concentración de URO I en sangre en estos animales fue probablemente insuficiente para conferirles algo de protección.

#### **7.4 Los patrones de lesiones y depósitos de PrP<sup>Sc</sup> no muestran diferencias entre animales sin trasplantar y trasplantados**

Con el objetivo de verificar si la URO I podría haber modificado el curso de la enfermedad priónica modificando el patrón lesional y/o la cantidad y distribución de los depósitos de PrP<sup>Sc</sup>, se realizó un estudio inmunohistopatológico de los encéfalos de animales TgVole, TgVUR (HO) y TgVole trasplantados. Dado que todos los animales se sacrificaron en una fase similar de la enfermedad, independientemente del tiempo de aparición espontánea que mostraran, se estudió en detalle su perfil lesional con el fin de poder detectar también si había habido una modificación de las propiedades de cepa.

Los resultados muestran que los animales TgVole presentan un patrón de lesiones bastante focalizado consistente en una espongiosis leve y depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en los núcleos talámicos (figura 26).

La figura 26 no muestra diferencias entre los animales TgVole y los animales TgVole trasplantados, presentando en ambos casos un patrón común característico que consiste en espongiosis de leve a moderada localizada en los núcleos posteriores del tálamo y en el cuerpo geniculado lateral. En estas mismas áreas se observa un patrón discreto de inmunomarcaje de PrP<sup>Sc</sup> de tipo punteado fino o sináptico. El resto de las áreas aparecen sin lesión. Sin embargo, en las muestras de los animales TgVUR (HO) se observa un patrón más variable dado que en una de las muestras se observa el mismo patrón de lesiones que el mencionado en los otros dos grupos de animales (figura 26), pero en otra muestra se observa un patrón totalmente distinto, con una espongiosis e inmunomarcaje de punteado fino de PrP<sup>Sc</sup> con una distribución más amplia afectando de forma clara al hipocampo, cuerpo estriado y cortezas cerebelosa y piriforme.



**Figura 26. Análisis histopatológico para evaluar la espongiosis y la presencia de depósitos de PrP<sup>Sc</sup> en los modelos animales TgVUR homocigotos, TgVole y TgVole trasplantados inoculados con una cepa priónica procedente de topillo rojo.** Para determinar si existen cambios en el patrón de lesiones, los depósitos o distribución de PrP<sup>Sc</sup> y si estos podrían verse alterados por la presencia de URO I en los animales TgVole trasplantados, se estudiaron las lesiones existentes en diferentes zonas del encéfalo de los modelos animales inoculados con la cepa CWD-Vole. Como controles se utilizaron animales TgVUR (HO) y animales TgVole. Los encéfalos previamente fijados con paraformaldehído y embebidos en parafina se tiñeron con hematoxilina-eosina y el estudio inmunohistoquímico para la detección de PrP<sup>Sc</sup> se realizó con el anticuerpo 6C2 (1:1 000). A) El grupo formado por los animales TgVole (n=6) exitosamente trasplantados, no mostraron ninguna diferencia ni en el patrón de lesiones ni en la localización y el marcaje de PrP<sup>Sc</sup> en relación con los ratones TgVole no trasplantados. B) El grupo de controles formado por los ratones TgVole (n=11) presenta un patrón común característico consistente en espongiosis leve/moderada localizada en los núcleos posteriores del tálamo y también en el cuerpo geniculado lateral. En estas mismas localizaciones se observa un patrón discreto de inmunomarcaje de PrP<sup>Sc</sup> de tipo punteado fino o sináptico. El resto de las áreas aparecen sin lesión. Además, el modelo se caracteriza por presentar intenso marcaje de fondo de PrP<sup>C</sup> (especialmente en hipocampo) y abundantes áreas de artefacto de sobreexpresión: marcaje puntiforme perineuronal no específico de PrP<sup>Sc</sup>. C) Sin embargo, el grupo de los animales TgVUR (HO) (n=4) presenta una gran variabilidad entre individuos, siendo dos de las muestras negativas, observándose en una de las muestras positivas un patrón muy similar a los animales TgVole y en la otra un patrón distinto, más severo, en el que se observa espongiosis e inmunomarcaje punteado fino de PrP<sup>Sc</sup> de amplia distribución que afecta de forma clara al hipocampo, cuerpo estriado, corteza cerebelosa y piriforme. Estos resultados indican que los elevados niveles de URO I que presentan los ratones TgVUR (HO) respecto a los animales TgVole o incluso los animales trasplantados, podría estar causando cierta alteración en las características de la cepa utilizada, aunque el bajo número de muestras que pudo analizarse impide la extracción de conclusiones robustas. H/E: Tinción hematoxilina – eosina, HO: Homocigoto, IHQ: Inmunohistoquímica.

## DISCUSIÓN

Las EET son un grupo de enfermedades neurodegenerativas letales que carecen de tratamiento en la actualidad, siendo necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que ralenticen o detengan su curso. En las últimas décadas se han descrito varios compuestos antipriónicos que inhiben la propagación del malplegamiento proteico, el evento central de las patologías causadas por priones. Esta búsqueda ha estado dificultada como consecuencia del desconocimiento sobre los mecanismos moleculares que controlan este evento dificultando enormemente el desarrollo de nuevas moléculas. De tal forma que, aunque se han testado numerosos compuestos en modelos *in vitro*, *in cellula* e *in vivo*, solo unos pocos han permitido implementar ensayos clínicos, no llegando ninguno de ellos a mostrar suficiente eficacia [318].

Hasta la fecha muchos de los estudios relacionados con la identificación de compuestos antipriónicos tenían como objetivo inhibir la propagación priónica a través de la interacción de estos con la PrP<sup>Sc</sup>. Sin embargo, la existencia de cepas priónicas dificulta la obtención de un compuesto que tenga un amplio espectro de actuación [1, 373]. Dado que la explicación más plausible del fenómeno de cepa se realizaría a través de la existencia de variantes conformacionales que perpetúan su estructura a través de su propagación, la interacción del compuesto antipriónico dependerá de cómo este se una a la correspondiente variante conformacional. De esta forma, si el mecanismo de acción del compuesto está mediado por su unión a la PrP<sup>Sc</sup>, con alta probabilidad mostrará un comportamiento diferencial para con cada una de las cepas a inhibir. Por el contrario, los compuestos que actúen uniéndose a la PrP<sup>C</sup>, estabilizando su conformación (conocidos como chaperonas moleculares), son aquellos que, probablemente tendrán un mayor espectro de actuación; teniendo en cuenta que la estructura y secuencia aminoacídica de la PrP<sup>C</sup> está altamente conservada entre especies. Además, los compuestos que actúan estabilizando la estructura de la PrP<sup>C</sup> son los que han demostrado tener menos efectos secundarios [374, 375]. Esto se debe a que el resto de las estrategias terapéuticas tienen como objetivo alterar procesos celulares complejos (silenciamiento de genes, disminución de la UPR, cambios en el sistema del proteasoma, etc.) que, al estar relacionados con otros procesos celulares vitales, pueden derivar en respuestas celulares no deseada [158]. De forma similar, se han descrito efectos secundarios al utilizar inmunoterapias activas como consecuencia de una exacerbada respuesta [301, 376]. En los últimos años se han desarrollado terapias basadas en nucleótidos antisentido (ASO) que actúan a través del silenciamiento de los ARN mensajeros del gen *PRNP*. Aunque esta prometedora aproximación terapéutica podría ser una candidata a terapia antipriónica, aún existen algunas incógnitas que habrá que resolver antes como los efectos de la reducción de los niveles de PrP<sup>C</sup> a largo plazo. Así como conocer mejor los mecanismos por los cuales algunos ASO testados están mostrando efectos tóxicos de origen desconocido [310, 311, 377]. Por todo ello, nuestro grupo de investigación, utilizando la experiencia adquirida en modelos de propagación priónica *in vitro*, dirige la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas a la detección de compuestos que actúen como chaperonas moleculares. En particular, la uroporfirina I (URO I) que se describe a lo largo de esta tesis doctoral, y que se trata de un compuesto muy prometedor dado que reúne todas las características deseables en una chaperona molecular.

La uroporfirina I es un tetrapirrol que presenta cuatro ácidos acéticos y cuatro ácidos propiónicos unidos a sus anillos pirrólicos. Se trata de un isómero que está ampliamente presente en la naturaleza y cuya acumulación en los diferentes tejidos, acaba causando alteraciones diversas. Colateralmente a su comportamiento como metabolito de la ruta hemo, esta molécula ha demostrado en experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, una extraordinaria capacidad para inhibir la propagación priónica. En particular, se ha mostrado que inhibe la propagación de los priones *in vitro* a muy bajas concentraciones (5  $\mu\text{M}$ ), pudiendo actuar sobre priones de diferentes especies. El estudio biofísico mediante RMN ha permitido estudiar el tipo y el lugar de interacción de este compuesto con la PrP humana, revelando que la unión no solo es muy estable, sino que parece ocurrir en una región muy conservada de la proteína que explicaría su comportamiento inhibitorio no dependiente de especie.

A pesar de la actividad inhibitoria de amplio espectro que presenta este metabolito, el grado de esta inhibición varía entre cepas; tanto en los experimentos realizados *in vitro* como *in vivo*. Este comportamiento también se ha descrito en otros compuestos como la anfotericina B, el compuesto B (compB), y la molécula IND24 [378-381]. A modo de ejemplo para explicitar estas diferencias, destacan los experimentos de PMCA realizados con encéfalo de ratón silvestre como sustrato donde se puede observar como el grado de inhibición presenta diferencias significativas entre las cepas utilizadas como semillas. Mientras que la inhibición es de 3125 veces cuando se utiliza la cepa RML, el compuesto únicamente consigue una inhibición de 125 veces con la cepa 22L. Estas diferencias que se observan en la capacidad inhibitoria podrían deberse a que la URO I podría no actuar únicamente estabilizando la estructura nativa de la PrP<sup>C</sup>, pudiendo existir algún otro tipo de interacción adicional con otros componentes del proceso. Por ejemplo, el compuesto podría unirse a la PrP<sup>C</sup> en un lugar que interfiriera con la interacción PrP<sup>C</sup> - PrP<sup>Sc</sup> para determinadas cepas, pero no para otras, que podrían presentar una región de interacción distinta. En este caso, además de un posible efecto estabilizador de la PrP<sup>C</sup>, en el caso de algunas cepas, se sumaría un efecto debido al bloqueo de la región de interacción entre ambas isoformas. También existe la posibilidad de que las diferencias detectadas se deban a la unión directa de la URO I con determinadas cepas de priones y no con otras, en función de la estructura tridimensional de cada cepa, lo que podría contribuir también a una mayor eficacia frente a aquellas con las que el compuesto pudiera interaccionar directamente. El desconocimiento actual sobre el mecanismo molecular del proceso de malplegamiento así como sobre la propia estructura de la PrP<sup>Sc</sup> dificultan enormemente comprender qué interacciones son clave y en qué moléculas intervinientes estas son más determinantes; en definitiva por qué se observan estas diferencias de inhibición entre las cepas priónicas utilizadas. No se puede descartar que estas diferencias se deban a factores exclusivos de cepa y al tipo de interacción que se establece entre proteínas. De esta forma, mientras que la URO I actuaría en ambas situaciones de igual forma, reduciendo por ejemplo la cantidad de PrP operativa que puede ser transformada, las diferencias entre cepas surgirían como consecuencia de que estas tendrían capacidades de propagación diferencial.

Un efecto similar de especificidad parcial se ha observado también tras utilizar diferentes variantes polimórficas de PrP<sup>C</sup>. Un ejemplo en esta dirección sería el experimento realizado *in vitro* con la proteína recombinante humana, donde se puede observar que, aun existiendo una inhibición por parte de la URO I a bajas concentraciones en ambos polimorfismos (129M o 129V), la capacidad inhibitoria de esta varía significativamente dependiendo de qué variante polimórfica se utiliza como sustrato. Existen distintas posibles explicaciones para entender estas diferencias: i) la presencia de un determinado residuo aminoacídico hace que la interacción PrP<sup>C</sup> – URO I se vea afectada. En este caso la PrP<sup>C</sup> con el polimorfismo 129M tendría una interacción más débil con la URO I, por lo que se observaría una menor inhibición a la misma concentración de compuesto; ii) el inóculo utilizado puede ser más efectivo propagándose en presencia de una PrP<sup>C</sup> con un polimorfismo concreto [382]. Aunque la interacción con ambos polimorfismos fuera muy similar, la cepa utilizada podría ser más eficiente propagándose en el sustrato 129M, observándose una menor inhibición; iii) ambas situaciones ocurren a la vez. Aunque los resultados obtenidos mediante RMN parecen indicar que el factor determinante es la interacción URO I – PrP<sup>C</sup>, por su elevada afinidad, no se puede descartar que la interacción PrP<sup>C</sup> – PrP<sup>Sc</sup> también se vea diferencialmente afectada en el caso de que los polimorfismos determinen residuos de interacción distintos, siendo en este caso una combinación de ambos efectos. Por otro lado, no se descarta la posibilidad de una interacción específica entre la URO I y la PrP<sup>Sc</sup> como mecanismo de acción de inhibición. No obstante, la imposibilidad de realizar experimentos de resonancia u otros estudios biofísicos con material infeccioso y altamente agregado, no ha permitido evaluar esta posibilidad.

Con el fin de determinar si el mecanismo de acción por el cual la URO I ejercía la inhibición podría estar relacionado con la estabilización de la PrP<sup>C</sup>, se realizó un experimento de unión proteína – ligando a través de RMN utilizando PrP<sup>C</sup> humana recombinante con el polimorfismo 129M. Esta técnica ya había demostrado su utilidad determinando la interacción del compuesto TMPyP-Fe(III) con la proteína priónica [340]. Se pretendía obtener la constante de disociación (Kd) del compuesto URO I y, de esta forma, conocer la afinidad de la URO I por la PrP<sup>C</sup> humana y compararla con la del TMPyP-Fe(III). Sin embargo, no se pudo calcular la Kd del compuesto con precisión, ya que al aumentar la concentración de URO I para superar la ratio 1:0.75 (proteína:compuesto), se observó la precipitación macroscópica del complejo PrP – URO I, imposibilitando su observación por RMN. Debido a que no se pudo determinar la ratio PrP – URO I al que la totalidad de las moléculas de PrP<sup>C</sup> tienen una molécula de URO I unidas a su estructura, fue imposible calcular con exactitud la Kd del compuesto. Este evento no es exclusivo de la URO I, sino que se ha descrito en otros compuestos con actividad antipriónica como el pentosan polisulfato (PPS, del inglés *Pentosan PolySulfate*), el rojo Congo o el galato de epigalocatequina (EGCG, del inglés *EpiGalloCatechin Gallate*) [383].

A pesar de que el cálculo de la Kd no resultó factible, sí que se pudo obtener mucha información a través de la medición de las alteraciones provocadas por los cambios químicos (CSP, del inglés *Chemical Shift Perturbation*) que se producían en la PrP<sup>C</sup> al interactuar con la URO I. Con la información extraída de estas CSP, se concluyó que hay ciertos residuos que se ven afectados más rápidamente que otros cuando

el URO I interacciona con la proteína. Se calculó que es necesario un promedio de  $\sim 24.5 \mu\text{M}$  de URO I para que los residuos que interaccionan con la URO I sufran la mitad del desplazamiento total. También se determinó que uno de los residuos que parece alterarse más rápidamente cuando entra en contacto con la URO I es el residuo 129, el cual sufriría la mitad de la alteración (o CSP) con una concentración de ligando de  $\sim 19.7 \mu\text{M}$ , respecto a la media que es  $\sim 24.5 \mu\text{M}$ . Todo ello, respaldaría los resultados obtenidos en PMCA con la proteína humana recombinante revelando que las diferencias observadas para cada una de las variantes polimórficas podrían deberse a la participación de este residuo en la interacción PrP – URO I. Por tanto, aunque la RMN nos ha permitido conocer información muy importante del potencial mecanismo de acción de la URO I, no ha sido suficiente para calcular su  $K_d$  o determinar con precisión qué residuos son decisivos en la interacción entre el compuesto y la PrP<sup>C</sup>. Para conseguir este objetivo serían útiles varias técnicas o metodologías, como la calorimetría isoterma de titulación (ITC, en inglés *Isothermal Titration Calorimetry*), que por sus características técnicas podría permitirnos alcanzar la concentración de saturación, evitando la agregación y consiguiente precipitación de la proteína. De esta forma podríamos calcular la  $K_d$  del compuesto evitando la limitación descrita anteriormente [384]. Este dato sería importante para los experimentos de administración *in vivo*, ya que de este modo se podría alcanzar la concentración óptima de URO I en el encéfalo de los animales infectados de forma que aseguremos la máxima efectividad del tratamiento evitando efectos secundarios indeseados. Otra técnica de gran utilidad sería la resonancia de plasmones superficiales (SPR, del inglés *Surface Plasmon Resonance*). Esta metodología permite analizar los cambios en el índice de refracción del medio cercano a una superficie metálica donde se monitoriza la unión del ligando a la proteína, que está inmovilizada en dicha superficie [385]. Esta técnica también podría evitar la precipitación de la PrP, ya que esta se encuentra anclada a una superficie, por lo que nos permitiría obtener la  $K_d$  de la interacción PrP – URO I [386].

Aunque los resultados obtenidos *in vitro* sugieren que la URO I presenta las características necesarias para convertirse en un potencial fármaco frente a las EET en el futuro, para que esto ocurra, es recomendable que el compuesto reúna otras propiedades igualmente importantes. La molécula se debe poder administrar de forma continua por vía oral o parenteral y debe permanecer en el organismo el tiempo necesario para que pueda ejercer su acción. Tal y como se ha mostrado en los resultados de farmacocinética, la URO I se elimina rápidamente a través de la orina y, acorde al modelo celular utilizado, presenta una baja permeabilidad a la barrera hematoencefálica. Esto unido a su baja solubilidad a pH neutro hace extremadamente difícil alcanzar cantidades suficientes de URO I que aseguren una concentración efectiva en el SNC tras su administración exógena. Este hecho llevó al diseño de una nueva estrategia que sirviera de alternativa a la administración tradicional del compuesto; la utilización de un modelo de ratón transgénico que, de forma intrínseca, genera niveles altos y constantes de URO I, como consecuencia de que está afectado de una porfiria eritropoyética congénita (CEP, del inglés *Congenital Erythropoietic Porphyria*) [357, 387]. El estudio *in vivo* se diseñó a modo de prueba de concepto con el fin de demostrar que cantidades adecuadas de URO I en el organismo y, en concreto en el SNC, podrían retrasar el desarrollo de una EET. Los resultados obtenidos demuestran que los animales modelo de la

CEP [TgURO (HO)] desarrollan una enfermedad priónica de aparición más lenta tras su infección con tres cepas murinas distintas. De forma similar a lo observado previamente *in vitro*, el grado de inhibición de la URO I, manifestado a través de la prolongación de los tiempos de incubación, fue dependiente de cepa. Los potenciales mecanismos de acción para comprender este comportamiento serían los mismos discutidos anteriormente para explicar la inhibición de la propagación priónica *in vitro*, también dependiente de cepa. Teniendo en cuenta que los niveles de URO I en la sangre y, por tanto, en el SNC de los animales infectados presentaban variabilidad y que se observó en la mayoría de los casos una relación significativa entre estos niveles y el retraso de la enfermedad, estos resultados sugieren que el factor determinante para conseguir un mayor retraso de la enfermedad son los niveles de URO I alcanzados en el SNC en cada animal; niveles determinados casi exclusivamente por la reducida permeabilidad que la barrera hematoencefálica presenta frente a esta molécula. En este sentido, cualquier procedimiento que pudiera aumentar su permeabilidad, aunque fuera de forma temporal, redundaría en un aumento de URO I en el SNC y, como consecuencia, en una extensión de los tiempos de incubación de la enfermedad. En este sentido, una de las metodologías más utilizadas en clínica es el aumento reversible y agudo de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica inducido por manitol. El manitol provoca una disrupción osmótica de la barrera incrementando su permeabilidad a diferentes compuestos. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en clínica para la administración de quimioterapias contra tumores cerebrales [388-390], por lo que podría utilizarse en caso de no conseguir otras vías de administración efectivas para la URO I.

Por otro lado, aunque las evidencias obtenidas sugieren que la prolongación del tiempo de supervivencia se debe a la presencia de al menos 2-5  $\mu\text{M}$  del compuesto en el encéfalo, no pueden descartarse otras posibles causas para los resultados observados. Dada la complejidad de la ruta de biosíntesis de la hemoglobina, la alteración introducida en la enzima UROIIIIS, además de la acumulación de URO I podría tener otros efectos sobre este proceso, llevando a la acumulación de otras porfirinas u otros metabolitos cuya posible actividad frente a la propagación priónica es desconocida. Por otro lado, la alteración de esta ruta biosintética podría también producir otros efectos fisiológicos con el objetivo de compensar la deficiencia causada por la mutación introducida. Sin embargo, el desconocimiento de dichos posibles efectos colaterales que pudieran padecer los animales transgénicos utilizados durante el estudio y su probablemente reducido efecto, hace que hayamos considerado la URO I como el efector más probable, tal y como sugieren los estudios realizados *in vitro* con el compuesto purificado.

El estudio previo a modo de prueba de concepto se enfocó en las enfermedades priónicas inducidas, donde el agente infeccioso se introducía en el organismo de forma exógena. Sin embargo, prácticamente la totalidad de las EET surgen de forma espontánea bien como consecuencia de una causa desconocida (esporádicas – 90%) o como consecuencia de la presencia de una mutación que acelera el proceso de malplegamiento (genéticas – 10%). Por esta razón, se generó un nuevo modelo de enfermedad que reunía todas las características necesarias: 1) producía altos niveles de URO I en sangre y 2) desarrollaba una enfermedad priónica de forma espontánea. Desafortunadamente, este nuevo modelo presentaba niveles

de URO I menores de los que presentaba el modelo TgURO (HO), tanto en sangre como en el SNC. Este hecho resultó sorprendente dado que para conseguir el nuevo modelo TgVUR 4x (HO), si bien no se pudo trabajar con animales singénicos, se utilizaron ratones con fondos genéticos similares. Esta diferencia en la concentración de URO I observada en los animales correlaciona con lo que se describe también en los pacientes que padecen porfiria eritropoyética congénita. Se ha observado que incluso individuos que presentan la misma mutación pueden presentar niveles de metabolito en sangre muy diferentes [391]. A pesar de que los niveles de URO I en estos animales eran más bajos, se observó un aumento de la supervivencia de un 17 %. Y se consiguieron tiempos de incubación de la enfermedad de hasta, un máximo de 259 días, valores nunca conseguidos después de estudiar más de 800 animales a lo largo de una década trabajando con el modelo de enfermedad espontánea. Este resultado positivo es el que mejor representa lo que podría ocurrir en un individuo que de forma endógena se le desencadenaría el malplegamiento con la consecuencia progresión de la enfermedad en un entorno con niveles de URO I por encima de los niveles basales. Probablemente, se podría inferir que, al menos de forma teórica, existirán niveles de URO I por encima de los cuales se impediría completamente el malplegamiento espontáneo y, por tanto, los animales nunca desarrollarían la enfermedad.

Dado que en ambos modelos se observó un retraso de la enfermedad priónica, bien inducida o espontánea, se quiso determinar si la URO I había producido modificaciones en la patología de estos animales que pudieran visualizarse a través del estudio histopatológico del encéfalo de estos animales. A pesar de que se observó una cierta variabilidad entre los individuos en términos de acumulación de PrP<sup>Sc</sup>, los patrones y el tipo de lesiones fueron muy similares cuando se compararon con la de los animales que actuaban como controles. Merece la pena destacar que los animales que presentaban niveles significativos de URO I en el SNC mostraron signos de una patología “más contenida” que aquellos animales que tenían niveles de URO I basales. Este resultado podría deberse a que la URO I actuaría conteniendo y/o evitando la dispersión de la PrP<sup>Sc</sup> en el encéfalo. Sería necesario un estudio en mayor profundidad para poder confirmar este efecto de la URO I o del complejo URO I - PrP<sup>C</sup>. Por último, en los estudios histopatológicos también se ha descrito un patrón de agregados en la sustancia blanca únicamente en los animales que presentan niveles altos de URO I en sangre. Este patrón específico podría ser una característica intrínseca de los nuevos modelos utilizados o podría deberse a que la presencia de URO I en el encéfalo habría seleccionado una cepa determinada que presenta este patrón característico. La selección de cepas priónicas utilizando compuestos que modifican la propagación priónica, por diferentes mecanismos, ha sido descrita previamente [161, 392, 393].

Una vez demostrado que niveles altos de URO I retrasaban la enfermedad tanto de forma inducida como aquella que aparecía de forma espontánea, el objetivo fue desarrollar una estrategia que permitiría trasladar esta capacidad a una situación real. Es decir, determinar cómo conseguir esa cantidad de metabolito necesaria en el SNC teniendo en cuenta la idiosincrasia de la molécula. Por esta razón, se diseñó un nuevo modelo que a modo de prueba de concepto permitiría evaluar una manera eficaz y realista de hacer llegar suficientes niveles de URO I en un animal de fenotipo silvestre. Se sabe que la

razón por la que los ratones modelo de la CEP presentan niveles muy elevados de URO I en sangre es consecuencia directa de que tienen alterada la ruta de biosíntesis de la hemoglobina; ruta que está mayoritariamente activada en la médula ósea. Además, los individuos que sufren CEP y tienen la enzima UROIIIIS defectuosa acumulan URO I en el citosol de las células de la médula ósea, mayoritariamente en los reticulocitos [394]. Es por ello por lo que el tratamiento que mejor resultado ha dado en personas afectadas de CEP es el trasplante de médula ósea. Mediante el trasplante se sustituyen las células hematopoyéticas con la UROIIIIS deficiente por células hematopoyéticas sanas [395-397]. Teniendo todo esto en cuenta y pensando en un futuro tratamiento para las EET, se diseñó un experimento para realizar el proceso inverso y convertir animales de fenotipo silvestre en animales porfíricos a través de un trasplante de médula. El objetivo era sustituir las células hematopoyéticas sanas por células hematopoyéticas porfíricas generando un nuevo modelo animal que, intrínsecamente, produjera grandes cantidades de URO I. Teniendo en cuenta que el trasplante podría limitar algo la supervivencia natural de los ratones objeto de estudio, se decidió trabajar con un modelo animal que permitiera infectarse con una cepa priónica rápida y que fuera aún infecciosa tras su inoculación en una dosis baja. Esto favorecería que, tras su inoculación, no aparecieran en el cerebro cantidades muy grandes del agente infeccioso difíciles de inhibir.

Tras una exitosa realización de trasplantes donde el 90% de los animales sobrevivieron y de estos el 100% mostraron presencia de URO I en sangre muy superiores a los observados en los ratones que actuaban como control, se inocularon con la cepa CWD-vole que reunía las características descritas anteriormente. El resultado de infección no mostró ninguna diferencia significativa en la supervivencia de los ratones trasplantados. La explicación más plausible se extrajo cuando se observó que los niveles de URO I en la sangre de estos animales, a pesar de ser muy superiores a los niveles de los animales que actuaban con control, no fueron lo suficientemente altos como para que llegara una cantidad suficiente de URO I al SNC e inhibiera la propagación priónica y, en consecuencia, el desarrollo de la enfermedad. Otra posible explicación implicaría a la cepa utilizada en el estudio, una cepa que se eligió por su rapidez pero que a su vez llevaba asociada una alta agresividad [284] que pudo ser la causa de la ausencia de bloqueo por parte de la URO I con las concentraciones alcanzadas en el SNC.

Se han barajado dos explicaciones para entender por qué los animales trasplantados no alcanzaron unos niveles de URO I en sangre suficientes para retrasar la enfermedad: 1) aunque todos los trasplantes realizados fueron satisfactorios y en los animales se habían implantado en todos los casos células hematopoyéticas porfíricas, un pequeño porcentaje de células del receptor podrían haber resistido la radiación inicial y haber permanecido en un porcentaje variable junto a las células trasplantadas, reduciendo la cantidad final de URO I efectiva en sangre; 2) si bien se sabe que la médula ósea es el tejido que proporciona una mayor cantidad de URO I a la sangre, el resto de tejidos que, como el hepático también tienen la ruta hemo activada, son también productores de URO I. Los animales trasplantados son incapaces de producir URO I en otros tejidos diferentes a la médula ósea, con la consecuencia disminución de este metabolito en sangre comparativamente con los animales modelo de la enfermedad.

Compaginando los resultados positivos anteriores donde se muestra que una cantidad suficiente de URO I en sangre retrasa la enfermedad de hasta cinco cepas diferentes (cuatro tras su inoculación y una generada espontáneamente), junto con la observación de que es posible y eficiente el trasplante de médula ósea productora de URO I, parece que la única limitación a esta novedosa estrategia terapéutica es la cantidad de URO I que el sistema es capaz de aportar a la sangre. Con el fin de que en un futuro, la terapia pueda aplicarse a todos aquellos individuos que estén en una fase de la enfermedad presintomática (portadores de mutaciones asociadas a las distintas enfermedades priónicas), se plantean realizar pruebas de concepto que demuestren que se pueden realizar autotrasplantes de médulas óseas modificadas genéticamente (edición con CRISPR-Cas9 o similar) con el objetivo de generar altos niveles de URO I. Teniendo en cuenta las capacidades que se disponen actualmente y que existen otras mutaciones en el gen de la URO I que dan lugar a aún mayores cantidades de URO I en sangre (73R, 53L o 22M [398]), el objetivo final será conseguir esta modificación genética de forma inducible y condicional a partir de la médula ósea extraída del paciente. La inducción condicional permitirá iniciar y parar la producción de la URO I por parte de la médula ósea autotrasplantada mediante el uso de compuestos comunes como la doxiciclina o el tamoxifeno. Esta estrategia evitaría los efectos colaterales del exceso de URO I en sangre de forma prolongada en el tiempo.

El fin último de cualquier terapia antiprionica es el de reducir la propagación prionica en el tejido donde esta ocurre y causa la enfermedad, el SNC. Sin embargo, existen otros tejidos como los pertenecientes al sistema linforetico en donde la propagación prionica también ocurre. Dependiendo del tipo de enfermedad esta puede ocurrir con anterioridad a la propagación que ocurre en el SNC o bien puede ocurrir en respuesta a una propagación prionica intensa que trata de expandirse a otros tejidos del organismo. Para estudiar si el metabolito objeto de estudio también interfería disminuyendo la propagación prionica en el sistema linforetico, se eligieron los bazo de los animales infectados por su alto contenido en PrP<sup>C</sup> y su fácil manejo. Para comprender la implicación de este sistema en las enfermedades priónicas, los priones llegan al sistema digestivo y allí son captados por las células M que los transportan a las placas de Peyer donde se realiza una presentación de antígeno a las células dendríticas foliculares. Se desconoce cuál es el método de dispersión y entrada hacia el SNC desde las células dendríticas foliculares, aunque se cree que se realiza a través de las fibras nerviosas que inervan el sistema linforetico [399]. También se ha descrito el proceso contrario, en el que los priones procedentes del SNC se dispersan hacia algunos órganos del sistema linforetico [241, 400]. Esta característica tan particular es un fenómeno que no ocurre con todas las cepas priónicas. Se ha descrito, sobre todo, en varias cepas de scrapie [166], en CWD [401] y en humanos, en la vCJD [234, 235]. Por el contrario, la cepa de BSE presenta fibras de PrP<sup>Sc</sup> mayoritariamente en el encéfalo y la retina, sin ninguna implicación del sistema linforetico [371].

Los resultados obtenidos confirmaron que la URO I inhibía significativamente la propagación en el bazo, aunque no se ha podido concluir si esta inhibición ocurrió tras el bloqueo de la PrP<sup>Sc</sup> que retrógradamente utilizaba la circulación sanguínea para acceder al sistema linforetico o era en el propio órgano,

extensamente bañado en sangre y, por tanto, con una alta concentración de URO I en él, capaz de inhibir la propagación priónica. Estos resultados sugerirían el uso de este compuesto a modo de terapia profiláctica tras la sospecha de ingestión de priones con tropismo linforeticular o una marcada sospecha de infección iatrogénica.

Los estudios presentados anteriormente, así como las propuestas de futuro que proponen implementar estrategias basadas en hacer llegar grandes cantidades de URO I de forma continua y así superar el impedimento que muestra la BHE al paso del metabolismo, podrían sustituirse por otras estrategias cuyo fin último fuera hacer llegar cantidades suficientes de URO I al encéfalo de forma directa. En la bibliografía se ha descrito la inoculación de compuestos antipriónicos directamente en el encéfalo de los modelos animales infectados, aumentando la supervivencia respecto a los animales administrados intraperitonealmente y sin efectos secundarios observables [339]. Sin embargo, otras estrategias son preferibles, en particular, 1) una estrategia que se saltaría la BHE tras la inoculación directa del compuesto en los ventrículos cerebrales y 2) una estrategia basada en la generación de macroestructuras con una mucho mayor permisibilidad a la BHE y que, conteniendo la URO I en su interior, atravesaría la barrera a modo de caballo de Troya. Las infusiones intraventriculares se han probado con éxito en ensayos preclínicos con el compuesto PPS [326] y en un ensayo clínico en individuos que padecían la enfermedad [327]. Si bien, en ambos casos la técnica resultó ser segura y no mostró complicaciones derivadas de la intervención, el compuesto PPS únicamente mostró un ligero efecto beneficioso sobre la progresión de la enfermedad o la supervivencia en los modelos murinos [326], dado que en el estudio realizado en humanos no se observó ninguna mejora aparente en el desarrollo de la enfermedad [327]. En esta dirección, se están realizando los estudios preliminares para evaluar los niveles de URO I que persisten tras su inoculación intraventricular de forma sostenida utilizando bombas osmóticas ALZET. Parte de esta experimentación se realizará en oveja y tratará de conocer el grado de difusión que muestra la URO I tras el paso de la barrera de células endoteliales, única barrera a flaquear tras su infusión intraventricular. Por otro lado, la estrategia denominada “caballo de Troya” implica la generación de grandes estructuras basadas en polipéptidos autoensamblables que encapsularían la URO I, permitiendo atravesar la barrera hematoencefálica y liberando el compuesto de forma dirigida y controlada en el encéfalo. Esta tecnología basada en conjugados polipeptídicos autoensamblables se está aplicando actualmente para la administración de distintos compuestos con fines similares [402, 403].

Aunque se ha demostrado que la URO I es un buen candidato a terapia antipriónica, es probable que las terapias futuras no se basen en el uso de un único compuesto con un único mecanismo de acción. Dada la complejidad de las enfermedades priónicas, es probable que sea necesario interferir a través de diferentes mecanismos de acción sobre una diversidad de procesos: malplegamiento, neurotoxicidad, interacción Pr<sup>PC</sup> - Pr<sup>Sc</sup>, etc. El uso de diferentes compuestos con acción sinérgica en la capacidad de inhibir la propagación priónica ya se ha probado en el pasado. La combinación de PPS y Fe(III)meso-tetra(4-sulfonatofenil)porfina (Fe-TSP) aumentó significativamente la supervivencia del modelo Tg7 inoculado con scrapie comparado con el uso de ambos compuestos por separado [404, 405]. Otro ejemplo

de sinergia es la combinación de quinacrina con simvastatina o desipramina en células ScN2a (neuroblastomas de ratón infectadas con *scrapie*), que además derivó en la creación de un compuesto que mezclaba las acciones de la quinacrina y la desipramina, llamado quinpramina, y que aumentaba la supervivencia en comparación con los compuestos de forma individual [406]. No solo en el campo de los priones se han observado los efectos, *a priori*, beneficiosos de la terapia combinada, sino en otras enfermedades como las sinucleopatías [407], el párkinson [408] o el alzhéimer [409].

A lo largo de esta tesis se han mostrado resultados que no dejan lugar a dudas sobre la capacidad de la URO I como potente compuesto inhibidor inespecífico de la propagación priónica. Por otro lado, se ha enfatizado la ventaja de que el compuesto sea además un metabolito celular que muestra una reducida toxicidad. Y se ha insistido en la idea de que el éxito o fracaso de una potencial terapia basada en este compuesto, depende casi exclusivamente de conseguir niveles constantes de URO I en el SNC por encima de 2 - 5  $\mu\text{m}$ . Por esta razón, el futuro del uso de la URO I dependerá de nuestra capacidad para conseguirlo desarrollando las distintas estrategias que se han descrito a lo largo de la tesis u otras que en el futuro los avances en la tecnología nos vayan ofreciendo.

**CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

1. La uroporfirina I presenta una mayor eficiencia que el TMPyP-Fe(III) inhibiendo la propagación de priones murinos *in vitro*.
2. La uroporfirina I inhibe la propagación *in vitro* de priones de diferentes especies de forma inespecífica, aunque a bajas concentraciones muestra diferencias en el grado de inhibición dependiendo del tipo de cepa priónica utilizada.
3. La uroporfirina I inhibe la propagación *in vitro* de priones recombinantes humanos 129V más eficientemente que aquellos con el polimorfismo 129M.
4. La caracterización mediante resonancia magnética nuclear de la interacción entre la PrP recombinante humana y la uroporfirina I ha permitido dilucidar los residuos aminoacídicos involucrados en la interacción con el compuesto.
5. El estudio de las propiedades farmacocinéticas de la uroporfirina I en ratones ha evidenciado su rápida eliminación a través de la orina, revelando las limitaciones para alcanzar niveles sistémicos elevados del compuesto tras su administración por vía parenteral.
6. El estudio de la capacidad de la uroporfirina I para atravesar la barrera hematoencefálica ha demostrado su baja permeabilidad a la misma, revelando así un importante impedimento para alcanzar los niveles de compuesto deseados en el sistema nervioso central.
7. La presencia de altas concentraciones de uroporfirina I de forma sostenida en sangre de modelos animales ha incrementado el tiempo de supervivencia entre un 10 y un 30 % en animales inoculados con distintas cepas de priones.
8. La presencia de altas concentraciones de uroporfirina I de forma sostenida en sangre de animales que, de forma espontánea, desarrollan una enfermedad priónica ha retrasado en un 17% la aparición de esta.
9. El trasplante de médula ósea productora de niveles elevados de uroporfirina I en animales de genotipo silvestre ha permitido conseguir concentraciones moderadas de uroporfirina I de forma sostenida en sangre. Estos niveles de producción del metabolito natural no han sido suficientes para incrementar el tiempo de supervivencia frente a una enfermedad priónica inducida.
10. En conjunto, los resultados obtenidos demuestran que la uroporfirina I podría convertirse en un compuesto terapéutico prometedor frente a las encefalopatías espongiiformes transmisibles, siempre que se consigan niveles suficientes de este compuesto en el SNC tras superar las limitaciones para su administración.

## REFERENCIAS

1. Weissmann, C., *The state of the prion*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(11): p. 861-71.
2. Budka, H., et al., *Neuropathological diagnostic criteria for Creutzfeldt-Jakob disease (CJD) and other human spongiform encephalopathies (prion diseases)*. Brain Pathol, 1995. **5**(4): p. 459-66.
3. Liberski, P.P., *Historical overview of prion diseases: a view from afar*. Folia Neuropathol, 2012. **50**(1): p. 1-12.
4. M'Gowan, J.P., *Investigation into the disease of sheep called 'scrapie' (Traberkrankheit: la tremblante) with especial reference to its association with sarcosporidiosis*. 1914, Edinburgh. 164.
5. Cuille, J. and P. Chelle, *La maladie dite tremblante du mouton est-elle inoculable?* CR Acad Sci., 1936. **203**: p. 1552-1554.
6. Wilson, D.R., R.D. Anderson, and W. Smith, *Studies in scrapie*. J Comp Pathol, 1950. **60**(4): p. 267-82.
7. Creutzfeldt, H., *Über eine eigenartige herdförmige Erkrankung des Zentralnervensystems*. Z Gesamte Neurol Psychiatr, 1920. **57**: p. 1-19.
8. Jakob, A., *Über eigenartige Erkrankungen des Zentralnervensystems mit bemerkenswertem anatomischem Befunde. (Spastische Pseudosklerose-Encephalomyelopathie mit disseminierten Degenerationsherden)*. Z Gesamte Neurol Psychiatr., 1921. **64**: p. 147-228.
9. Masters, C.L., D.C. Gajdusek, and C.J. Gibbs, Jr., *Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Straussler syndrome with an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies*. Brain, 1981. **104**(3): p. 559-88.
10. Liberski, P.P., et al., *Kuru, the First Human Prion Disease*. Viruses, 2019. **11**(3).
11. Hadlow, W.J., *Scrapie and Kuru*. Lancet, 1959. **2**: p. 289-290.
12. Gajdusek, C., C. Gibbs, and M. Alpers, *Experimental transmission of kuru-like syndrome to chimpanzees*. Nature, 1966. **209**: p. 794-796.
13. Gibbs, C.J., Jr., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease (spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee*. Science, 1968. **161**(3839): p. 388-9.
14. Sigurdson, B., *Maedi, a slow progressing pernumonia of sheep: An epizootological and pathological study*. British Vet J, 1954. **110**: p. 255-258.
15. Pattison, I.H. and G.C. Millson, *Scrapie produced experimentally in goats with special reference to the clinical syndrome*. J Comp Pathol, 1961. **71**: p. 101-9.
16. Chandler, R.L., *Encephalopathy in mice produced by inoculation with scrapie brain material*. Lancet, 1961. **1**(7191): p. 1378-9.
17. Pattison, I.H., *Scrapie--a personal view*. J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol), 1972. **6**: p. 110-4.
18. Alper, T., D.A. Haig, and M.C. Clarke, *The exceptionally small size of the scrapie agent*. Biochem Biophys Res Commun, 1966. **22**(3): p. 278-84.
19. Alper, T., et al., *Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid?* Nature, 1967. **214**(5090): p. 764-6.
20. Griffith, J.S., *Self-replication and scrapie*. Nature, 1967. **215**(5105): p. 1043-4.

21. Prusiner, S.B., *Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie*. Science, 1982. **216**(4542): p. 136-44.
22. Bolton, D.C., M.P. McKinley, and S.B. Prusiner, *Identification of a protein that purifies with the scrapie prion*. Science, 1982. **218**(4579): p. 1309-11.
23. Merz, P.A., et al., *Abnormal fibrils from scrapie-infected brain*. Acta Neuropathol, 1981. **54**(1): p. 63-74.
24. McKinley, M.P., D.C. Bolton, and S.B. Prusiner, *A protease-resistant protein is a structural component of the scrapie prion*. Cell, 1983. **35**(1): p. 57-62.
25. Prusiner, S.B., et al., *Scrapie prions aggregate to form amyloid-like birefringent rods*. Cell, 1983. **35**(2 Pt 1): p. 349-58.
26. Chesebro, B., et al., *Identification of scrapie prion protein-specific mRNA in scrapie-infected and uninfected brain*. Nature, 1985. **315**(6017): p. 331-3.
27. Oesch, B., et al., *A cellular gene encodes scrapie PrP 27-30 protein*. Cell, 1985. **40**(4): p. 735-46.
28. Basler, K., et al., *Scrapie and cellular PrP isoforms are encoded by the same chromosomal gene*. Cell, 1986. **46**(3): p. 417-28.
29. Caughey, B. and G.J. Raymond, *The scrapie-associated form of PrP is made from a cell surface precursor that is both protease- and phospholipase-sensitive*. J Biol Chem, 1991. **266**(27): p. 18217-23.
30. Stahl, N., et al., *Glycosylinositol phospholipid anchors of the scrapie and cellular prion proteins contain sialic acid*. Biochemistry, 1992. **31**(21): p. 5043-53.
31. Pan, K.M., et al., *Conversion of alpha-helices into beta-sheets features in the formation of the scrapie prion proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(23): p. 10962-6.
32. Gasset, M., et al., *Perturbation of the secondary structure of the scrapie prion protein under conditions that alter infectivity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(1): p. 1-5.
33. Meyer, R.K., et al., *Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(8): p. 2310-4.
34. Cohen, F.E. and S.B. Prusiner, *Pathologic conformations of prion proteins*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 793-819.
35. Fraser, H. and M. Bruce, *Argyrophilic plaques in mice inoculated with scrapie from particular sources*. Lancet, 1973. **1**(7803): p. 617-8.
36. Gambetti, P., et al., *A novel human disease with abnormal prion protein sensitive to protease*. Ann Neurol, 2008. **63**(6): p. 697-708.
37. Hsiao, K., et al., *Linkage of a prion protein missense variant to Gerstmann-Straussler syndrome*. Nature, 1989. **338**(6213): p. 342-5.
38. Minikel, E.V., et al., *Quantifying prion disease penetrance using large population control cohorts*. Sci Transl Med, 2016. **8**(322).
39. Fraser, H., et al., *Transmission of bovine spongiform encephalopathy and scrapie to mice*. J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 8): p. 1891-7.

40. Tateishi, J., et al., *Experimental transmission of human subacute spongiform encephalopathy to small rodents. III. Further transmission from three patients and distribution patterns of lesions in mice.* Acta Neuropathol, 1981. **53**(2): p. 161-3.
41. Scott, M., et al., *Transgenic mice expressing hamster prion protein produce species-specific scrapie infectivity and amyloid plaques.* Cell, 1989. **59**(5): p. 847-57.
42. Bueler, H., et al., *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie.* Cell, 1993. **73**(7): p. 1339-47.
43. Westaway, D., et al., *Degeneration of skeletal muscle, peripheral nerves, and the central nervous system in transgenic mice overexpressing wild-type prion proteins.* Cell, 1994. **76**(1): p. 117-29.
44. Bueler, H., et al., *High prion and PrP<sup>Sc</sup> levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene.* Mol Med, 1994. **1**(1): p. 19-30.
45. Hsiao, K.K., et al., *Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with mutant prion protein.* Science, 1990. **250**(4987): p. 1587-90.
46. Torres, J.M., et al., *Spontaneous generation of infectious prion disease in transgenic mice.* Emerg Infect Dis, 2013. **19**(12): p. 1938-47.
47. Jackson, W.S., et al., *Spontaneous generation of prion infectivity in fatal familial insomnia knockin mice.* Neuron, 2009. **63**(4): p. 438-50.
48. Jackson, K.S., et al., *Preference toward a polylysine enantiomer in inhibiting prions.* Amino Acids, 2013. **44**(3): p. 993-1000.
49. Watts, J.C., et al., *Spontaneous generation of rapidly transmissible prions in transgenic mice expressing wild-type bank vole prion protein.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(9): p. 3498-503.
50. Kocisko, D.A., et al., *Cell-free formation of protease-resistant prion protein.* Nature, 1994. **370**(6489): p. 471-4.
51. Saborio, G.P., B. Permanne, and C. Soto, *Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding.* Nature, 2001. **411**(6839): p. 810-3.
52. Castilla, J., P. Saa, and C. Soto, *Detection of prions in blood.* Nat Med, 2005. **11**(9): p. 982-5.
53. Castilla, J., et al., *In vitro generation of infectious scrapie prions.* Cell, 2005. **121**(2): p. 195-206.
54. Legname, G., et al., *Synthetic mammalian prions.* Science, 2004. **305**(5684): p. 673-6.
55. Makarava, N., et al., *Recombinant prion protein induces a new transmissible prion disease in wild-type animals.* Acta Neuropathol, 2010. **119**(2): p. 177-87.
56. Kim, J.I., et al., *Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors.* J Biol Chem, 2010. **285**(19): p. 14083-7.
57. Wang, F., et al., *Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein.* Science, 2010. **327**(5969): p. 1132-5.
58. Manuelidis, L., *Transmissible encephalopathies: speculations and realities.* Viral Immunol, 2003. **16**(2): p. 123-39.
59. Diack, A.B. and J.C. Bartz, *Experimental models of human prion diseases and prion strains.* Handb Clin Neurol, 2018. **153**: p. 69-84.

60. Sigurdson, C.J., et al., *Prion strain discrimination using luminescent conjugated polymers*. Nat Methods, 2007. **4**(12): p. 1023-30.
61. Laferriere, F., et al., *Quaternary structure of pathological prion protein as a determining factor of strain-specific prion replication dynamics*. PLoS Pathog, 2013. **9**(10): p. e1003702.
62. Saijo, E., et al., *PrPSc-Specific Antibody Reveals C-terminal Conformational Differences between Prion Strains*. J Virol, 2016.
63. Fernández-Borges, N., et al., *Cofactors influence the biological properties of infectious recombinant prions*. Acta Neuropathol, 2017.
64. Burke, C., et al., *Full restoration of specific infectivity and strain properties from pure mammalian prion protein*. PLoS Pathog, 2019. **15**(3): p. e1007662.
65. Erana, H., et al., *Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies*. PLoS Pathog, 2019. **15**(10): p. e1008117.
66. Aguzzi, A. and A.M. Calella, *Prions: protein aggregation and infectious diseases*. Physiol Rev, 2009. **89**(4): p. 1105-52.
67. Sparkes, R.S., et al., *Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(19): p. 7358-62.
68. Sakudo, A., et al., *Structure of the prion protein and its gene: an analysis using bioinformatics and computer simulation*. Curr Protein Pept Sci. **11**(2): p. 166-79.
69. Gabriel, J.M., et al., *Molecular cloning of a candidate chicken prion protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(19): p. 9097-101.
70. Rivera-Milla, E., C.A. Stuermer, and E. Malaga-Trillo, *An evolutionary basis for scrapie disease: identification of a fish prion mRNA*. Trends Genet, 2003. **19**(2): p. 72-5.
71. Simonic, T., et al., *cDNA cloning of turtle prion protein*. FEBS Lett, 2000. **469**(1): p. 33-8.
72. Strumbo, B., et al., *Molecular cloning of the cDNA coding for Xenopus laevis prion protein*. FEBS Lett, 2001. **508**(2): p. 170-4.
73. Calzolari, L., et al., *Prion protein NMR structures of chickens, turtles, and frogs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 651-5.
74. Gill, A.C. and A.R. Castle, *The cellular and pathologic prion protein*. Handb Clin Neurol, 2018. **153**: p. 21-44.
75. Morris, R.J., C.J. Parkyn, and A. Jen, *Traffic of prion protein between different compartments on the neuronal surface, and the propagation of prion disease*. FEBS Lett, 2006. **580**(23): p. 5565-71.
76. Riek, R., et al., *NMR characterization of the full-length recombinant murine prion protein, mPrP(23-231)*. FEBS Lett, 1997. **413**(2): p. 282-8.
77. Zahn, R., *The octapeptide repeats in mammalian prion protein constitute a pH-dependent folding and aggregation site*. J Mol Biol, 2003. **334**(3): p. 477-88.
78. Wopfner, F., et al., *Analysis of 27 mammalian and 9 avian PrPs reveals high conservation of flexible regions of the prion protein*. J Mol Biol, 1999. **289**(5): p. 1163-78.

79. Goldfarb, L.G., et al., *Transmissible familial Creutzfeldt-Jakob disease associated with five, seven, and eight extra octapeptide coding repeats in the PRNP gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(23): p. 10926-30.
80. Areskeviciute, A., et al., *A Novel Eight Octapeptide Repeat Insertion in PRNP Causing Prion Disease in a Danish Family*. J Neuropathol Exp Neurol, 2019. **78**(7): p. 595-604.
81. Brown, D.R., et al., *The cellular prion protein binds copper in vivo*. Nature, 1997. **390**(6661): p. 684-7.
82. Lysek, D.A., et al., *Prion protein NMR structures of cats, dogs, pigs, and sheep*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(3): p. 640-5.
83. Katorcha, E., et al., *Sialylation of prion protein controls the rate of prion amplification, the cross-species barrier, the ratio of PrP<sup>Sc</sup> glycoform and prion infectivity*. PLoS Pathog, 2014. **10**(9): p. e1004366.
84. Yi, C.W., et al., *Glycosylation Significantly Inhibits the Aggregation of Human Prion Protein and Decreases Its Cytotoxicity*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 12603.
85. Camacho, M.V., et al., *Role of prion protein glycosylation in replication of human prions by protein misfolding cyclic amplification*. Lab Invest, 2019. **99**(11): p. 1741-1748.
86. Puig, B., H. Altmepfen, and M. Glatzel, *The GPI-anchoring of PrP*. Prion, 2014. **8**(1): p. 11-18.
87. Wu, E.L., et al., *Insight into Early-Stage Unfolding of GPI-Anchored Human Prion Protein*. Biophys J, 2015. **109**(10): p. 2090-100.
88. Baron, G.S. and B. Caughey, *Effect of glycosylphosphatidylinositol anchor-dependent and -independent prion protein association with model raft membranes on conversion to the protease-resistant isoform*. J Biol Chem, 2003. **278**(17): p. 14883-92.
89. Marshall, K.E., et al., *PrP Knockout Cells Expressing Transmembrane PrP Resist Prion Infection*. J Virol, 2017. **91**(2).
90. Puig, B., et al., *GPI-anchor signal sequence influences PrP<sup>C</sup> sorting, shedding and signalling, and impacts on different pathomechanistic aspects of prion disease in mice*. PLoS Pathog, 2019. **15**(1): p. e1007520.
91. Chesebro, B., et al., *Fatal transmissible amyloid encephalopathy: a new type of prion disease associated with lack of prion protein membrane anchoring*. PLoS Pathog, 2010. **6**(3): p. e1000800.
92. Richt, J.A., et al., *Production of cattle lacking prion protein*. Nat Biotechnol, 2007. **25**(1): p. 132-8.
93. Salvesen, O., et al., *Goats naturally devoid of PrP(C) are resistant to scrapie*. Vet Res, 2020. **51**(1): p. 1.
94. Mallucci, G., et al., *Depleting neuronal PrP in prion infection prevents disease and reverses spongiosis*. Science, 2003. **302**(5646): p. 871-4.
95. Brandner, S., et al., *Normal host prion protein (PrP<sup>C</sup>) is required for scrapie spread within the central nervous system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(23): p. 13148-51.
96. Corbett, G.T., et al., *PrP is a central player in toxicity mediated by soluble aggregates of neurodegeneration-causing proteins*. Acta Neuropathol, 2020. **139**(3): p. 503-526.

97. Chiesa, R., *The elusive role of the prion protein and the mechanism of toxicity in prion disease*. PLoS Pathog, 2015. **11**(5): p. e1004745.
98. Collinge, J., et al., *Prion protein is necessary for normal synaptic function*. Nature, 1994. **370**(6487): p. 295-7.
99. Coitinho, A.S., et al., *Cellular prion protein ablation impairs behavior as a function of age*. Neuroreport, 2003. **14**(10): p. 1375-9.
100. Criado, J.R., et al., *Mice devoid of prion protein have cognitive deficits that are rescued by reconstitution of PrP in neurons*. Neurobiol Dis, 2005. **19**(1-2): p. 255-65.
101. Tobler, I., et al., *Altered circadian activity rhythms and sleep in mice devoid of prion protein*. Nature, 1996. **380**(6575): p. 639-42.
102. Mercer, R.C., et al., *The prion protein modulates A-type K<sup>+</sup> currents mediated by Kv4.2 complexes through dipeptidyl aminopeptidase-like protein 6*. J Biol Chem, 2013. **288**(52): p. 37241-55.
103. Powell, A.D., et al., *Alterations in Ca<sup>2+</sup>-buffering in prion-null mice: association with reduced afterhyperpolarizations in CA1 hippocampal neurons*. J Neurosci, 2008. **28**(15): p. 3877-86.
104. Weise, J., et al., *Deletion of cellular prion protein results in reduced Akt activation, enhanced postischemic caspase-3 activation, and exacerbation of ischemic brain injury*. Stroke, 2006. **37**(5): p. 1296-300.
105. Watt, N.T., et al., *Prion protein facilitates uptake of zinc into neuronal cells*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1134.
106. Gasperini, L., et al., *In Absence of the Cellular Prion Protein, Alterations in Copper Metabolism and Copper-Dependent Oxidase Activity Affect Iron Distribution*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 437.
107. Bremer, J., et al., *Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance*. Nat Neurosci, 2010. **13**(3): p. 310-8.
108. Wulf, M.A., A. Senatore, and A. Aguzzi, *The biological function of the cellular prion protein: an update*. BMC Biol, 2017. **15**(1): p. 34.
109. Biasini, E. and D.A. Harris, *Targeting the cellular prion protein to treat neurodegeneration*. Future Med Chem, 2012. **4**(13): p. 1655-8.
110. Bremer, J., et al., *Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance*. Nat Neurosci. **13**(3): p. 310-8.
111. Kuffer, A., et al., *The prion protein is an agonistic ligand of the G protein-coupled receptor Adgrg6*. Nature, 2016. **536**(7617): p. 464-8.
112. Safar, J., et al., *Thermal stability and conformational transitions of scrapie amyloid (prion) protein correlate with infectivity*. Protein Sci, 1993. **2**(12): p. 2206-16.
113. Requena, J.R. and H. Wille, *The structure of the infectious prion protein*. Prion, 2014. **8**(1): p. 60-66.
114. Smirnovas, V., et al., *Structural organization of brain-derived mammalian prions examined by hydrogen-deuterium exchange*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(4): p. 504-6.
115. Groveman, B.R., et al., *Parallel in-register intermolecular beta-sheet architectures for prion-seeded prion protein (PrP) amyloids*. J Biol Chem, 2014. **289**(35): p. 24129-42.

116. Bartz, J.C., *Prion Strain Diversity*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016. **6**(12).
117. Gabizon, R., M.P. McKinley, and S.B. Prusiner, *Purified prion proteins and scrapie infectivity copartition into liposomes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(12): p. 4017-21.
118. Silveira, J.R., et al., *The most infectious prion protein particles*. Nature, 2005. **437**(7056): p. 257-61.
119. Prusiner, S.B., et al., *Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication*. Cell, 1990. **63**(4): p. 673-86.
120. Meier, P., et al., *Soluble dimeric prion protein binds PrP(Sc) in vivo and antagonizes prion disease*. Cell, 2003. **113**(1): p. 49-60.
121. Engelke, A.D., et al., *Dimerization of the cellular prion protein inhibits propagation of scrapie prions*. J Biol Chem, 2018. **293**(21): p. 8020-8031.
122. Horiuchi, M., et al., *Interactions between heterologous forms of prion protein: binding, inhibition of conversion, and species barriers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(11): p. 5836-41.
123. Kocisko, D.A., et al., *Species specificity in the cell-free conversion of prion protein to protease-resistant forms: a model for the scrapie species barrier*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(9): p. 3923-7.
124. Jarrett, J.T. and P.T. Lansbury, Jr., *Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: a pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie?* Cell, 1993. **73**(6): p. 1055-8.
125. Zukas, A.A., C.E. Bruederle, and J.M. Carter, *Sonication induced intermediate in prion protein conversion*. Protein Pept Lett, 2008. **15**(2): p. 206-11.
126. Meisl, G., et al., *Scaling behaviour and rate-determining steps in filamentous self-assembly*. Chem Sci, 2017. **8**(10): p. 7087-7097.
127. Igel-Egalon, A., et al., *Reversible unfolding of infectious prion assemblies reveals the existence of an oligomeric elementary brick*. PLoS Pathog, 2017. **13**(9): p. e1006557.
128. Igel-Egalon, A., et al., *Heterogeneity and Architecture of Pathological Prion Protein Assemblies: Time to Revisit the Molecular Basis of the Prion Replication Process?* Viruses, 2019. **11**(5).
129. Diring, H., et al., *Highly infectious purified preparations of disease-specific amyloid of transmissible spongiform encephalopathies are not devoid of nucleic acids of viral size*. Intervirology, 1997. **40**(4): p. 238-46.
130. Cobb, N.J. and W.K. Surewicz, *Prion diseases and their biochemical mechanisms*. Biochemistry, 2009. **48**(12): p. 2574-85.
131. Diaz-Espinoza, R. and C. Soto, *High-resolution structure of infectious prion protein: the final frontier*. Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(4): p. 370-7.
132. Vazquez-Fernandez, E., et al., *Structural organization of mammalian prions as probed by limited proteolysis*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50111.
133. Sevillano, A.M., et al., *Recombinant PrP<sup>Sc</sup> shares structural features with brain-derived PrP<sup>Sc</sup>: Insights from limited proteolysis*. PLoS Pathog, 2018. **14**(1): p. e1006797.
134. Peretz, D., et al., *A conformational transition at the N terminus of the prion protein features in formation of the scrapie isoform*. J Mol Biol, 1997. **273**(3): p. 614-22.

135. McKinley, M.P., et al., *Molecular characteristics of prion rods purified from scrapie-infected hamster brains*. J Infect Dis, 1986. **154**(1): p. 110-20.
136. Sim, V.L. and B. Caughey, *Ultrastructures and strain comparison of under-glycosylated scrapie prion fibrils*. Neurobiol Aging, 2009. **30**(12): p. 2031-42.
137. Vazquez-Fernandez, E., et al., *The Structural Architecture of an Infectious Mammalian Prion Using Electron Cryomicroscopy*. PLoS Pathog, 2016. **12**(9): p. e1005835.
138. Eanes, E. and G. Glenner, *X-ray diffraction studies on amyloid filaments*. J Histochem Cytochem., 1968. **16**(11): p. 673-677.
139. Eisenberg, D.S. and M.R. Sawaya, *Structural Studies of Amyloid Proteins at the Molecular Level*. Annu Rev Biochem, 2017. **86**: p. 69-95.
140. Nelson, R., et al., *Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils*. Nature, 2005. **435**(7043): p. 773-8.
141. Sawaya, M.R., et al., *Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 453-7.
142. Govaerts, C., et al., *Evidence for assembly of prions with left-handed beta-helices into trimers*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8342-7.
143. Cobb, N.J., et al., *Molecular architecture of human prion protein amyloid: a parallel, in-register beta-structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(48): p. 18946-51.
144. Baskakov, I.V., et al., *The prion 2018 round tables (I): the structure of PrP(Sc)*. Prion, 2019. **13**(1): p. 46-52.
145. Wille, H., et al., *Natural and synthetic prion structure from X-ray fiber diffraction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(40): p. 16990-5.
146. Serpell, L.C., M. Sunde, and C.C. Blake, *The molecular basis of amyloidosis*. Cell Mol Life Sci, 1997. **53**(11-12): p. 871-87.
147. Silva, C.J., et al., *Proteinase K and the structure of PrPSc: The good, the bad and the ugly*. Virus Res, 2015. **207**: p. 120-6.
148. Baskakov, I.V. and E. Katorcha, *Multifaceted Role of Sialylation in Prion Diseases*. Front Neurosci, 2016. **10**: p. 358.
149. Bruce, M.E. and H. Fraser, *Scrapie strain variation and its implications*. Curr Top Microbiol Immunol, 1991. **172**: p. 125-38.
150. Bruce, M.E., *TSE strain variation*. Br Med Bull, 2003. **66**: p. 99-108.
151. Bessen, R.A. and R.F. Marsh, *Identification of two biologically distinct strains of transmissible mink encephalopathy in hamsters*. J Gen Virol, 1992. **73** ( Pt 2): p. 329-34.
152. Bessen, R.A. and R.F. Marsh, *Distinct PrP properties suggest the molecular basis of strain variation in transmissible mink encephalopathy*. J Virol, 1994. **68**(12): p. 7859-68.
153. Race, R.E., et al., *Comparison of abnormal prion protein glycoform patterns from transmissible spongiform encephalopathy agent-infected deer, elk, sheep, and cattle*. J Virol, 2002. **76**(23): p. 12365-8.

154. Castilla, J., et al., *Cell-free propagation of prion strains*. EMBO J, 2008. **27**(19): p. 2557-66.
155. Tagliavini, F., et al., *A 7-kDa prion protein (PrP) fragment, an integral component of the PrP region required for infectivity, is the major amyloid protein in Gerstmann-Straussler-Scheinker disease A117V*. J Biol Chem, 2001. **276**(8): p. 6009-15.
156. Benestad, S.L., et al., *Cases of scrapie with unusual features in Norway and designation of a new type, Nor98*. Vet Rec, 2003. **153**(7): p. 202-8.
157. Mahal, S.P., et al., *Prion strain discrimination in cell culture: the cell panel assay*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20908-13.
158. Aguzzi, A., M. Heikenwalder, and M. Polymenidou, *Insights into prion strains and neurotoxicity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 552-61.
159. Ghaemmaghami, S., et al., *Continuous quinacrine treatment results in the formation of drug-resistant prions*. PLoS Pathog, 2009. **5**(11): p. e1000673.
160. Oelschlegel, A. and C. Weissmann, *Acquisition of Drug Resistance and Dependence by Prions*. PLoS Pathog, 2013. **9**(2).
161. Berry, D.B., et al., *Drug resistance confounding prion therapeutics*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(44).
162. Ghaemmaghami, S., *Biology and Genetics of PrP Prion Strains*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(8).
163. Will, R.G., et al., *A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK*. Lancet, 1996. **347**(9006): p. 921-5.
164. Scott, M., et al., *Transgenic Mice Expressing Hamster Prion Protein Produce Species-Specific Scrapie Infectivity and Amyloid Plaques*. Cell, 1989. **59**: p. 847-857.
165. Dickinson, A.G., V.M. Meikle, and H. Fraser, *Identification of a gene which controls the incubation period of some strains of scrapie agent in mice*. J Comp Pathol, 1968. **78**(3): p. 293-9.
166. Kimberlin, R.H., C.A. Walker, and H. Fraser, *The genomic identity of different strains of mouse scrapie is expressed in hamsters and preserved on reisolation in mice*. J Gen Virol, 1989. **70** ( Pt 8): p. 2017-25.
167. Carlson, G.A., et al., *Genetics and polymorphism of the mouse prion gene complex: control of scrapie incubation time*. Mol Cell Biol, 1988. **8**(12): p. 5528-40.
168. Collinge, J., et al., *Transmission of fatal familial insomnia to laboratory animals*. Lancet, 1995. **346**(8974): p. 569-70.
169. Büeler, H., et al., *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 1992. **356**: p. 577-582.
170. Mallucci, G.R., et al., *Targeting cellular prion protein reverses early cognitive deficits and neurophysiological dysfunction in prion-infected mice*. Neuron, 2007. **53**(3): p. 325-35.
171. Brandner, S., et al., *Normal host prion protein necessary for scrapie-induced neurotoxicity*. Nature, 1996. **379**(6563): p. 339-43.
172. Chesebro, B., et al., *Anchorless prion protein results in infectious amyloid disease without clinical scrapie*. Science, 2005. **308**(5727): p. 1435-9.

173. Hsiao, K., et al., *Spontaneous neurodegeneration in transgenic mice with prion protein codon 101 proline----leucine substitution*. Ann N Y Acad Sci, 1991. **640**: p. 166-70.
174. Collinge, J., *Variant Creutzfeldt-Jakob disease*. Lancet, 1999. **354**(9175): p. 317-23.
175. Baskakov, I.V., et al., *Pathway complexity of prion protein assembly into amyloid*. J Biol Chem, 2002. **277**(24): p. 21140-8.
176. Simoneau, S., et al., *In vitro and in vivo neurotoxicity of prion protein oligomers*. PLoS Pathog, 2007. **3**(8): p. e125.
177. Karpinar, D.P., et al., *Pre-fibrillar alpha-synuclein variants with impaired beta-structure increase neurotoxicity in Parkinson's disease models*. EMBO J, 2009. **28**(20): p. 3256-68.
178. Mc Donald, J.M., et al., *The presence of sodium dodecyl sulphate-stable Abeta dimers is strongly associated with Alzheimer-type dementia*. Brain, 2010. **133**(Pt 5): p. 1328-41.
179. Barbieri, G., et al., *Silencing of cellular prion protein (PrPC) expression by DNA-antisense oligonucleotides induces autophagy-dependent cell death in glioma cells*. Autophagy, 2011. **7**(8): p. 840-53.
180. Xu, Y., et al., *Activation of the macroautophagic system in scrapie-infected experimental animals and human genetic prion diseases*. Autophagy, 2012. **8**(11): p. 1604-20.
181. Hughes, D. and M. Halliday, *What Is Our Current Understanding of PrP(Sc)-Associated Neurotoxicity and Its Molecular Underpinnings?* Pathogens, 2017. **6**(4).
182. Liberski, P.P., et al., *Neuronal autophagic vacuoles in experimental scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease*. Acta Neuropathol, 1992. **83**(2): p. 134-9.
183. Lopez-Perez, O., et al., *Dysregulation of autophagy in the central nervous system of sheep naturally infected with classical scrapie*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 1911.
184. Heiseke, A., et al., *Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy*. J Neurochem, 2009. **109**(1): p. 25-34.
185. Cortes, C.J., et al., *Rapamycin delays disease onset and prevents PrP plaque deposition in a mouse model of Gerstmann-Straussler-Scheinker disease*. J Neurosci, 2012. **32**(36): p. 12396-405.
186. Karapetyan, Y.E., et al., *Unique drug screening approach for prion diseases identifies tacrolimus and astemizole as anti-prion agents*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(17): p. 7044-9.
187. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. Toxicol Pathol, 2007. **35**(4): p. 495-516.
188. Giese, A., et al., *Neuronal cell death in scrapie-infected mice is due to apoptosis*. Brain Pathol, 1995. **5**(3): p. 213-21.
189. Kovacs, G.G. and H. Budka, *Distribution of apoptosis-related proteins in sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. Brain Res. **1323**: p. 192-9.
190. Couplier, M., et al., *Bax deletion does not protect neurons from BSE-induced death*. Neurobiol Dis, 2006. **23**(3): p. 603-11.
191. Steele, A.D., et al., *Diminishing apoptosis by deletion of Bax or overexpression of Bcl-2 does not protect against infectious prion toxicity in vivo*. J Neurosci, 2007. **27**(47): p. 13022-7.

192. Glickman, M.H. and A. Ciechanover, *The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 373-428.
193. McKinnon, C., et al., *Prion-mediated neurodegeneration is associated with early impairment of the ubiquitin-proteasome system*. *Acta Neuropathol*, 2016. **131**(3): p. 411-25.
194. Deriziotis, P., et al., *Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry*. *EMBO J*, 2011. **30**(15): p. 3065-77.
195. Kristiansen, M., et al., *Disease-associated prion protein oligomers inhibit the 26S proteasome*. *Mol Cell*, 2007. **26**(2): p. 175-88.
196. Schroder, M., *The unfolded protein response*. *Mol Biotechnol*, 2006. **34**(2): p. 279-90.
197. Walter, P. and D. Ron, *The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation*. *Science*, 2011. **334**(6059): p. 1081-6.
198. Moreno, J.A., et al., *Sustained translational repression by eIF2alpha-P mediates prion neurodegeneration*. *Nature*, 2012. **485**(7399): p. 507-11.
199. Halliday, M. and G.R. Mallucci, *Targeting the unfolded protein response in neurodegeneration: A new approach to therapy*. *Neuropharmacology*, 2014. **76 Pt A**: p. 169-74.
200. Moreno, J., et al., *Oral Treatment Targeting the Unfolded Protein Response Prevents Neurodegeneration and Clinical Disease in Prion-Infected Mice*. *Sci Transl Med*, 2013. **5**.
201. Choi, S.I., et al., *Mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in the brains of hamsters infected with the 263 K scrapie agent*. *Acta Neuropathol*, 1998. **96**(3): p. 279-86.
202. Carroll, J.A., et al., *Microglia Are Critical in Host Defense Against Prion Disease*. *J Virol*, 2018.
203. Giese, A., et al., *Role of microglia in neuronal cell death in prion disease*. *Brain Pathol*, 1998. **8**(3): p. 449-57.
204. Parchi, P., et al., *Typing prion isoforms*. *Nature*, 1997. **386**(6622): p. 232-4.
205. Kovacs, G.G., et al., *Genetic prion disease: the EUROCD experience*. *Hum Genet*, 2005. **118**(2): p. 166-74.
206. Mastrianni, J.A., *The genetics of prion diseases*. *Genet Med*. **12**(4): p. 187-95.
207. Belay, E.D., *Transmissible spongiform encephalopathies in humans*. *Annu Rev Microbiol*, 1999. **53**: p. 283-314.
208. Imran, M. and S. Mahmood, *An overview of human prion diseases*. *Virol J*, 2011. **8**: p. 559.
209. Jeong, B. and Y. Kim, *Genetic studies in human prion diseases*. *J Korean Med Sci.*, 2014. **29**(5): p. 623-632.
210. Ladogana, A. and G.G. Kovacs, *Genetic Creutzfeldt-Jakob disease*. *Handb Clin Neurol*, 2018. **153**: p. 219-242.
211. Schmitz, M., et al., *Hereditary Human Prion Diseases: an Update*. *Mol Neurobiol*, 2016.
212. Gambetti, P., et al., *Sporadic and familial CJD: classification and characterisation*. *Br Med Bull*, 2003. **66**: p. 213-39.

213. Rossi, G., et al., *Creutzfeldt-Jakob disease with a novel four extra-repeat insertional mutation in the PrP gene*. *Neurology*, 2000. **55**(3): p. 405-10.
214. Capellari, S., et al., *Genetic Creutzfeldt-Jakob disease and fatal familial insomnia: insights into phenotypic variability and disease pathogenesis*. *Acta Neuropathol*, 2011. **121**(1): p. 21-37.
215. Ironside, J.W., D.L. Ritchie, and M.W. Head, *Prion diseases*. *Handb Clin Neurol*, 2017. **145**: p. 393-403.
216. Ritchie, D.L. and J.W. Ironside, *Neuropathology of Human Prion Diseases*. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017. **150**: p. 319-339.
217. Lugaresi, E., et al., *Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(16): p. 997-1003.
218. Zerr, I., et al., *Phenotypic variability in fatal familial insomnia (D178N-129M) genotype*. *Neurology*, 1998. **51**(5): p. 1398-405.
219. Zarranz, J.J., et al., *Phenotypic variability in familial prion diseases due to the D178N mutation*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005. **76**(11): p. 1491-6.
220. Jansen, C., et al., *Prion protein amyloidosis with divergent phenotype associated with two novel nonsense mutations in PRNP*. *Acta Neuropathol*. **119**(2): p. 189-97.
221. Kretzschmar, H.A., *Human prion diseases (spongiform encephalopathies)*. *Arch Virol Suppl*, 1993. **7**: p. 261-93.
222. Duffy, P., et al., *Letter: Possible person-to-person transmission of Creutzfeldt-Jakob disease*. *N Engl J Med*, 1974. **290**(12): p. 692-3.
223. Kobayashi, A., T. Kitamoto, and H. Mizusawa, *Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease*. *Handb Clin Neurol*, 2018. **153**: p. 207-218.
224. Bonda, D.J., et al., *Human prion diseases: surgical lessons learned from iatrogenic prion transmission*. *Neurosurg Focus*, 2016. **41**(1): p. E10.
225. Will, R.G. and J.W. Ironside, *Sporadic and Infectious Human Prion Diseases*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017. **7**(1).
226. Rudge, P., et al., *Iatrogenic CJD due to pituitary-derived growth hormone with genetically determined incubation times of up to 40 years*. *Brain*, 2015. **138**(Pt 11): p. 3386-99.
227. Ritchie, D.L., et al., *UK Iatrogenic Creutzfeldt-Jakob disease: investigating human prion transmission across genotypic barriers using human tissue-based and molecular approaches*. *Acta Neuropathol*, 2017. **133**(4): p. 579-595.
228. Will, R.G., *Acquired prion disease: iatrogenic CJD, variant CJD, kuru*. *Br Med Bull*, 2003. **66**: p. 255-65.
229. Zeidler, M., et al., *New variant Creutzfeldt-Jakob disease: psychiatric features*. *Lancet*, 1997. **350**(9082): p. 908-10.
230. Zeidler, M., et al., *New variant Creutzfeldt-Jakob disease: neurological features and diagnostic tests*. *Lancet*, 1997. **350**(9082): p. 903-7.

231. Ironside, J.W., et al., *Variant Creutzfeldt-Jakob disease: prion protein genotype analysis of positive appendix tissue samples from a retrospective prevalence study*. *BMJ*, 2006. **332**(7551): p. 1186-8.
232. Gill, O.N., et al., *Prevalent abnormal prion protein in human appendixes after bovine spongiform encephalopathy epizootic: large scale survey*. *BMJ*, 2013. **347**: p. f5675.
233. Mok, T., et al., *Variant Creutzfeldt-Jakob Disease in a Patient with Heterozygosity at PRNP Codon 129*. *New England Journal of Medicine*, 2017. **376**(3): p. 292-294.
234. Bishop, M.T., et al., *PRNP variation in UK sporadic and variant Creutzfeldt Jakob disease highlights genetic risk factors and a novel non-synonymous polymorphism*. *BMC Med Genet*, 2009. **10**: p. 146.
235. Hilton, D.A., et al., *Prevalence of lymphoreticular prion protein accumulation in UK tissue samples*. *J Pathol*, 2004. **203**(3): p. 733-9.
236. Head, M.W., et al., *Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease: an immunohistochemical, quantitative, and biochemical study*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(1): p. 143-53.
237. Kimberlin, R.H. and C.A. Walker, *Pathogenesis of scrapie in mice after intragastric infection*. *Virus Res*, 1989. **12**(3): p. 213-20.
238. Muramoto, T., et al., *Accumulation of abnormal prion protein in mice infected with Creutzfeldt-Jakob disease via intraperitoneal route: a sequential study*. *Am J Pathol*, 1993. **143**(5): p. 1470-9.
239. Schreuder, B.E., et al., *Tonsillar biopsy and PrPSc detection in the preclinical diagnosis of scrapie*. *Vet Rec*, 1998. **142**(21): p. 564-8.
240. Andreoletti, O., et al., *Atypical/Nor98 scrapie infectivity in sheep peripheral tissues*. *PLoS Pathog*, 2011. **7**(2): p. e1001285.
241. Shikiya, R.A., et al., *PrPSc formation and clearance as determinants of prion tropism*. *PLoS Pathog*, 2017. **13**(3): p. e1006298.
242. Ladogana, A., et al., *Mortality from Creutzfeldt-Jakob disease and related disorders in Europe, Australia, and Canada*. *Neurology*, 2005. **64**(9): p. 1586-91.
243. Parchi, P., et al., *Classification of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease based on molecular and phenotypic analysis of 300 subjects*. *Ann Neurol*, 1999. **46**(2): p. 224-33.
244. Parchi, P., et al., *Inter-laboratory assessment of PrPSc typing in creutzfeldt-jakob disease: a Western blot study within the NeuroPrion Consortium*. *Brain Pathol*, 2009. **19**(3): p. 384-91.
245. Mastrianni, J.A., et al., *Prion protein conformation in a patient with sporadic fatal insomnia*. *N Engl J Med*, 1999. **340**(21): p. 1630-8.
246. Puoti, G., et al., *Sporadic human prion diseases: molecular insights and diagnosis*. *Lancet Neurol*, 2012. **11**(7): p. 618-28.
247. Cracco, L., B.S. Appleby, and P. Gambetti, *Fatal familial insomnia and sporadic fatal insomnia*. *Handb Clin Neurol*, 2018. **153**: p. 271-299.
248. Gambetti, P., G. Puoti, and W.Q. Zou, *Variably protease-sensitive prionopathy: a novel disease of the prion protein*. *J Mol Neurosci*, 2011. **45**(3): p. 422-4.

249. Zou, W.Q., et al., *Variably protease-sensitive prionopathy: a new sporadic disease of the prion protein*. *Ann Neurol*, 2010. **68**(2): p. 162-72.
250. van Duijn, C.M., et al., *Case-control study of risk factors of Creutzfeldt-Jakob disease in Europe during 1993-95. European Union (EU) Collaborative Study Group of Creutzfeldt-Jakob disease (CJD)*. *Lancet*, 1998. **351**(9109): p. 1081-5.
251. Brown, P., et al., *The epidemiology of Creutzfeldt-Jakob disease: conclusion of a 15-year investigation in France and review of the world literature*. *Neurology*, 1987. **37**(6): p. 895-904.
252. Houston, F. and O. Andreoletti, *Animal prion diseases: the risks to human health*. *Brain Pathol*, 2019. **29**(2): p. 248-262.
253. Cassard, H., et al., *Evidence for zoonotic potential of ovine scrapie prions*. *Nat Commun*, 2014. **5**: p. 5821.
254. Race, B., et al., *Chronic wasting disease agents in nonhuman primates*. *Emerg Infect Dis*, 2014. **20**(5): p. 833-7.
255. Raymond, G.J., et al., *Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle and sheep to chronic wasting disease*. *EMBO J*, 2000. **19**(17): p. 4425-30.
256. Saa, P., J. Castilla, and C. Soto, *Cyclic amplification of protein misfolding and aggregation*. *Methods Mol Biol*, 2005. **299**: p. 53-65.
257. Castilla, J., et al., *Protein misfolding cyclic amplification for diagnosis and prion propagation studies*. *Methods Enzymol*, 2006. **412**: p. 3-21.
258. Saa, P., J. Castilla, and C. Soto, *Ultra-efficient replication of infectious prions by automated protein misfolding cyclic amplification*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(46): p. 35245-52.
259. Castilla, J., et al., *Crossing the species barrier by PrP(Sc) replication in vitro generates unique infectious prions*. *Cell*, 2008. **134**(5): p. 757-68.
260. Saa, P., J. Castilla, and C. Soto, *Presymptomatic detection of prions in blood*. *Science*, 2006. **313**(5783): p. 92-4.
261. Kim, J.I., et al., *Mammalian prions generated from bacterially expressed prion protein in the absence of any mammalian cofactors*. *J Biol Chem*. **285**(19): p. 14083-7.
262. Wang, F., et al., *Generating a prion with bacterially expressed recombinant prion protein*. *Science*. **327**(5969): p. 1132-5.
263. Zhang, Y., et al., *Comparison of 2 synthetically generated recombinant prions*. *Prion*, 2014. **8**(2): p. 215-220.
264. Deleault, N.R., et al., *Isolation of phosphatidylethanolamine as a solitary cofactor for prion formation in the absence of nucleic acids*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(22): p. 8546-51.
265. Wagner, J., et al., *Anle138b: a novel oligomer modulator for disease-modifying therapy of neurodegenerative diseases such as prion and Parkinson's disease*. *Acta Neuropathol*, 2013. **125**(6): p. 795-813.
266. Massignan, T., et al., *A cationic tetrapyrrole inhibits toxic activities of the cellular prion protein*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 23180.

267. Fan, Y., et al., *TMPyP Inhibits Amyloid-beta Aggregation and Alleviates Amyloid-Induced Cytotoxicity*. ACS Omega, 2017. **2**(8): p. 4188-4195.
268. Qin, K., et al., *Anle138b prevents PrP plaque accumulation in Tg(PrP-A116V) mice but does not mitigate clinical disease*. J Gen Virol, 2019. **100**(6): p. 1027-1037.
269. Wilham, J.M., et al., *Rapid end-point quantitation of prion seeding activity with sensitivity comparable to bioassays*. PLoS Pathog, 2010. **6**(12): p. e1001217.
270. Xue, C., et al., *Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation*. R Soc Open Sci, 2017. **4**(1): p. 160696.
271. Schmitz, M., et al., *Application of an in vitro-amplification assay as a novel pre-screening test for compounds inhibiting the aggregation of prion protein scrapie*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 28711.
272. Atarashi, R., et al., *Ultrasensitive human prion detection in cerebrospinal fluid by real-time quaking-induced conversion*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 175-8.
273. Orru, C.D., et al., *A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings*. N Engl J Med, 2014. **371**(6): p. 519-29.
274. Cheng, Y.C., et al., *Early and Non-Invasive Detection of Chronic Wasting Disease Prions in Elk Feces by Real-Time Quaking Induced Conversion*. PLoS One, 2016. **11**(11): p. e0166187.
275. González-Miranda, E., *Adaptación de un sistema de propagación de priones in vitro para el cribado masivo de compuestos específicos frente a las encefalopatías espongiiformes transmisibles humanas*, in *Neurociencias*. 2020, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitatea
276. Charco, J.M., *Desarrollo de un nuevo sistema de cribado masivo basado en la propagación in vitro de priones recombinantes infecciosos para la detección de compuestos con actividad anti-priónica.*, in *Neurociencias*. 2018, Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibersitatea.
277. Loch, C., et al., *Molecular cloning and complete sequence of prion protein cDNA from mouse brain infected with the scrapie agent*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6372-6.
278. Bueler, H., et al., *Normal development and behaviour of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein*. Nature, 1992. **356**(6370): p. 577-82.
279. Manson, J.C., et al., *129/Ola Mice Carrying a Null Mutation in PrP that Abolishes mRNA Production Are Developmentally Normal*. Molecular Neurobiology, 1994. **8**(2-3): p. 121-127.
280. Vilotte, J.L., et al., *Markedly increased susceptibility to natural sheep scrapie of transgenic mice expressing ovine prp*. J Virol, 2001. **75**(13): p. 5977-84.
281. Diack, A.B., J.D. Alibhai, and J.C. Manson, *Gene Targeted Transgenic Mouse Models in Prion Research*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2017. **150**: p. 157-179.
282. Watts, J.C., et al., *Evidence that bank vole PrP is a universal acceptor for prions*. PLoS Pathog, 2014. **10**(4): p. e1003990.
283. Orru, C.D., et al., *Bank Vole Prion Protein As an Apparently Universal Substrate for RT-QuIC-Based Detection and Discrimination of Prion Strains*. PLoS Pathog, 2015. **11**(6): p. e1004983.
284. Di Bari, M.A., et al., *Chronic wasting disease in bank voles: characterisation of the shortest incubation time model for prion diseases*. PLoS Pathog, 2013. **9**(3): p. e1003219.

285. Watts, J.C., et al., *Towards authentic transgenic mouse models of heritable PrP prion diseases*. Acta Neuropathol, 2016.
286. David, A.S., R. Grant, and J.P. Ballantyne, *Unsuccessful treatment of Creutzfeldt-Jakob disease with acyclovir*. Lancet, 1984. **1**(8375): p. 512-513.
287. Terzano, M.G., et al., *The effect of amantadine on arousal and EEG patterns in Creutzfeldt-Jakob disease*. Arch Neurol, 1983. **40**(9): p. 555-9.
288. Kovanen, J., A. Tiilikainen, and M. Haltia, *Histocompatibility antigens in familial Creutzfeldt-Jakob disease*. J Neurol Sci, 1980. **45**(2-3): p. 317-21.
289. Furlow, T.W.J., R.J. Whitley, and F.J. Wilmes, *Repeated suppression of Creutzfeldt-Jakob disease with vidarabine*. Lancet, 1982. **2**(8297): p. 564-565.
290. Otto, M., et al., *Efficacy of flupirtine on cognitive function in patients with CJD: A double-blind study*. Neurology, 2004. **62**(5): p. 714-8.
291. Imperiale, D., et al., *Levetiracetam control of myoclonus in a patient with Creutzfeldt-Jakob disease*. Eur Neurol, 2003. **49**(3): p. 189-90.
292. Brody, D.L. and D.M. Holtzman, *Active and passive immunotherapy for neurodegenerative disorders*. Annu Rev Neurosci, 2008. **31**: p. 175-93.
293. Sigurdsson, E.M., et al., *Immunization delays the onset of prion disease in mice*. Am J Pathol, 2002. **161**(1): p. 13-7.
294. Marciniuk, K., et al., *Development of a multivalent, PrP(Sc)-specific prion vaccine through rational optimization of three disease-specific epitopes*. Vaccine, 2014. **32**(17): p. 1988-97.
295. Taschuk, R., et al., *Safety, specificity and immunogenicity of a PrP(Sc)-specific prion vaccine based on the YYR disease specific epitope*. Prion, 2014. **8**(1): p. 51-9.
296. Enari, M., E. Flechsig, and C. Weissmann, *Scrapie prion protein accumulation by scrapie-infected neuroblastoma cells abrogated by exposure to a prion protein antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(16): p. 9295-9.
297. Peretz, D., et al., *Antibodies inhibit prion propagation and clear cell cultures of prion infectivity*. Nature, 2001. **412**(6848): p. 739-43.
298. White, A.R., et al., *Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease*. Nature, 2003. **422**(6927): p. 80-3.
299. Dyer, C., *British man with CJD gets experimental treatment in world first*. BMJ, 2018. **363**: p. k4608.
300. Pulgar, V.M., *Transcytosis to Cross the Blood Brain Barrier, New Advancements and Challenges*. Front Neurosci, 2018. **12**: p. 1019.
301. Solfrosi, L., et al., *Cross-linking cellular prion protein triggers neuronal apoptosis in vivo*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1514-6.
302. Sonati, T., et al., *The toxicity of anti-prion antibodies is mediated by the flexible tail of the prion protein*. Nature, 2013. **501**(7465): p. 102-6.
303. Herrmann, U.S., et al., *Structure-based drug design identifies polythiophenes as anti-prion compounds*. Sci Transl Med, 2015. **7**(299).

304. Büeler, H., et al., *Mice devoid of PrP are resistant to scrapie*. Cell, 1993. **73**: p. 1339-1347.
305. Bate, C., et al., *Glimepiride reduces the expression of PrP<sup>C</sup>, prevents PrP<sup>Sc</sup> formation and protects against prion mediated neurotoxicity in cell lines*. PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8221.
306. Khvorova, A. and J.K. Watts, *The chemical evolution of oligonucleotide therapies of clinical utility*. Nat Biotechnol, 2017. **35**(3): p. 238-248.
307. DeVos, S.L., et al., *Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy*. Sci Transl Med, 2017. **9**(374).
308. Scoles, D.R., et al., *Antisense oligonucleotide therapy for spinocerebellar ataxia type 2*. Nature, 2017. **544**(7650): p. 362-366.
309. Southwell, A.L., et al., *Huntingtin suppression restores cognitive function in a mouse model of Huntington's disease*. Sci Transl Med, 2018. **10**(461).
310. Raymond, G.J., et al., *Antisense oligonucleotides extend survival of prion-infected mice*. JCI Insight, 2019. **5**.
311. Nazor Friberg, K., et al., *Intracerebral Infusion of Antisense Oligonucleotides Into Prion-infected Mice*. Mol Ther Nucleic Acids, 2012. **1**: p. e9.
312. Chi, X., P. Gatti, and T. Papoian, *Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics*. Drug Discov Today, 2017. **22**(5): p. 823-833.
313. Ingrosso, L., A. Ladogana, and M. Pocchiari, *Congo red prolongs the incubation period in scrapie-infected hamsters*. J Virol, 1995. **69**(1): p. 506-8.
314. Poli, G., et al., *Evaluation of anti-prion activity of congo red and its derivatives in experimentally infected hamsters*. Arzneimittelforschung, 2004. **54**(7): p. 406-15.
315. Thellung, S., et al., *Autophagy Activator Drugs: A New Opportunity in Neuroprotection from Misfolded Protein Toxicity*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(4).
316. Kahan, B., *Toxicity spectrum of inhibitors of mammalian target of rapamycin in organ transplantation: etiology, pathogenesis and treatment*. Expert Opin Drug Saf, 2011. **10**(5): p. 727-49.
317. Halliday, M., et al., *Partial restoration of protein synthesis rates by the small molecule ISRIB prevents neurodegeneration without pancreatic toxicity*. Cell Death and Disease, 2015. **6**(3): p. e1672.
318. Teruya, K. and K. Doh-Ura, *Insights from Therapeutic Studies for PrP Prion Disease*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2017. **7**(3).
319. Doh-Ura, K., T. Iwaki, and B. Caughey, *Lysosomotropic agents and cysteine protease inhibitors inhibit scrapie-associated prion protein accumulation*. J Virol, 2000. **74**(10): p. 4894-7.
320. Korth, C., et al., *Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9836-41.
321. Collins, S.J., et al., *Quinacrine does not prolong survival in a murine Creutzfeldt-Jakob disease model*. Ann Neurol, 2002. **52**(4): p. 503-6.
322. Barret, A., et al., *Evaluation of quinacrine treatment for prion diseases*. J Virol, 2003. **77**(15): p. 8462-9.

323. Collinge, J., et al., *Safety and efficacy of quinacrine in human prion disease (PRION-1 study): a patient-preference trial*. *Lancet Neurol*, 2009. **8**(4): p. 334-44.
324. Geschwind, M.D., et al., *Quinacrine treatment trial for sporadic Creutzfeldt-Jakob disease*. *Neurology*, 2013. **81**(23): p. 2015-23.
325. Farquhar, C.F. and A.G. Dickinson, *Prolongation of scrapie incubation period by an injection of dextran sulphate 500 within the month before or after infection*. *J Gen Virol*, 1986. **67 ( Pt 3)**: p. 463-73.
326. Doh-ura, K., et al., *Treatment of transmissible spongiform encephalopathy by intraventricular drug infusion in animal models*. *J Virol*, 2004. **78**(10): p. 4999-5006.
327. Tsuboi, Y., K. Doh-Ura, and T. Yamada, *Continuous intraventricular infusion of pentosan polysulfate: clinical trial against prion diseases*. *Neuropathology*, 2009. **29**(5): p. 632-6.
328. De Luigi, A., et al., *The efficacy of tetracyclines in peripheral and intracerebral prion infection*. *PLoS One*, 2008. **3**(3): p. e1888.
329. Haïk, S., et al., *Doxycycline in Creutzfeldt-Jakob disease: a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. *The Lancet Neurology*, 2014. **13**(2): p. 150-158.
330. Varges, D., et al., *Doxycycline in early CJD: a double-blinded randomised phase II and observational study*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2017. **88**(2): p. 119-125.
331. Forloni, G., et al., *Preventive study in subjects at risk of fatal familial insomnia: Innovative approach to rare diseases*. *Prion*, 2015. **9**(2): p. 75-9.
332. Lu, D., et al., *Biaryl amides and hydrazones as therapeutics for prion disease in transgenic mice*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013. **347**(2): p. 325-38.
333. Merlini, G., et al., *Interaction of the anthracycline 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin with amyloid fibrils: inhibition of amyloidogenesis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2959-63.
334. Tagliavini, F., et al., *Effectiveness of anthracycline against experimental prion disease in Syrian hamsters*. *Science*, 1997. **276**(5315): p. 1119-22.
335. Bonkovsky, H.L., et al., *Porphyria and heme metabolism and the porphyrias*. *Compr Physiol*, 2013. **3**(1): p. 365-401.
336. Rodwell, V.W. and R.K. Murray, *Porfirinas y pigmentos biliares*, in *Harper Bioquímica Ilustrada*. 2015, Mc Graw Hill. p. 323-335.
337. Puy, H., L. Gouya, and J.C. Deybach, *Porphyrias*. *Lancet*, 2010. **375**(9718): p. 924-37.
338. Caughey, W.S., et al., *Inhibition of protease-resistant prion protein formation by porphyrins and phthalocyanines*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(21): p. 12117-22.
339. Priola, S.A., A. Raines, and W.S. Caughey, *Porphyria and phthalocyanine antiscrapie compounds*. *Science*, 2000. **287**(5457): p. 1503-6.
340. Nicoll, A.J., et al., *Pharmacological chaperone for the structured domain of human prion protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(41): p. 17610-5.
341. Dong, C., et al., *Characterizing the inhibition of alpha-synuclein oligomerization by a pharmacological chaperone that prevents prion formation by the protein PrP*. *Protein Sci*, 2019. **28**(9): p. 1690-1702.

342. Khurana, R., et al., *Supramolecular Nanorods of (N-Methylpyridyl) Porphyrin With Captisol: Effective Photosensitizer for Anti-bacterial and Anti-tumor Activities*. *Front Chem*, 2019. **7**: p. 452.
343. Sun, X., et al., *Aptamer-assisted superparamagnetic iron oxide nanoparticles as multifunctional drug delivery platform for chemo-photodynamic combination therapy*. *J Mater Sci Mater Med*, 2019. **30**(7): p. 76.
344. Di Pierro, E., V. Brancaleoni, and F. Granata, *Advances in understanding the pathogenesis of congenital erythropoietic porphyria*. *Br J Haematol*, 2016. **173**(3): p. 365-79.
345. Ramanujam, V.S. and K.E. Anderson, *Porphyria Diagnostics-Part 1: A Brief Overview of the Porphyrias*. *Curr Protoc Hum Genet*, 2015. **86**: p. 17 20 1-17 20 26.
346. Balwani, M. and R.J. Desnick, *The porphyrias: advances in diagnosis and treatment*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2012. **2012**: p. 19-27.
347. Dailey, H.A., *Enzymes of heme biosynthesis*. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 1997. **2**(4): p. 411-417.
348. Woods, J.S., et al., *Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor*. *J Toxicol Environ Health*, 1993. **40**(2-3): p. 235-46.
349. Schmid, R., S. Schwartz, and C.J. Watson, *Porphyrin content of bone marrow and liver in the various forms of porphyria*. *AMA Arch Intern Med*, 1954. **93**(2): p. 167-90.
350. Schmid, R. and D. Shemin, *The Enzymatic Formation of Porphobilinogen From  $\delta$ -Aminolevulinic Acid and Its Conversion To Protoporphyrin1*. *Journal of the American Chemical Society*, 1955. **77**(2): p. 506-507.
351. Ged, C., et al., *Congenital erythropoietic porphyria: report of a novel mutation with absence of clinical manifestations in a homozygous mutant sibling*. *J Invest Dermatol*, 2004. **123**(3): p. 589-91.
352. Erwin, A., M. Balwani, and R.J. Desnick, *Congenital Erythropoietic Porphyria*, in *GeneReviews((R))*, M.P. Adam, et al., Editors. 2013: Seattle (WA).
353. Pandey, M., et al., *Report of a novel Indian case of congenital erythropoietic porphyria and overview of therapeutic options*. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2013. **35**(4): p. e167-70.
354. Urquiza, P., et al., *Repurposing ciclopirox as a pharmacological chaperone in a model of congenital erythropoietic porphyria*. *Sci Transl Med*, 2018. **10**(459).
355. Fritsch, C., et al., *Congenital erythropoietic porphyria*. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 1997. **36**(4): p. 594-610.
356. Shaw, P.H., et al., *Treatment of congenital erythropoietic porphyria in children by allogeneic stem cell transplantation: a case report and review of the literature*. *Bone Marrow Transplantation*, 2001. **27**: p. 101-105.
357. Ged, C., et al., *A knock-in mouse model of congenital erythropoietic porphyria*. *Genomics*, 2006. **87**(1): p. 84-92.
358. Berrow, N.S., et al., *A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications*. *Nucleic Acids Res*, 2007. **35**(6): p. e45.

359. Yuan, J., et al., *Recombinant human prion protein inhibits prion propagation in vitro*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2911.
360. Kong, Q., et al., *Chronic wasting disease of elk: transmissibility to humans examined by transgenic mouse models*. *J Neurosci*, 2005. **25**(35): p. 7944-9.
361. Cronier, S., et al., *Prion strain- and species-dependent effects of antiprion molecules in primary neuronal cultures*. *J Virol*, 2007. **81**(24): p. 13794-800.
362. Fernandez-Borges, N., J. de Castro, and J. Castilla, *In vitro studies of the transmission barrier*. *Prion*, 2009. **3**(4): p. 220-3.
363. Zahn, R., *Prion propagation and molecular chaperones*. *Q Rev Biophys*, 1999. **32**(4): p. 309-70.
364. Recio, J.S., et al., *Bone marrow contributes simultaneously to different neural types in the central nervous system through different mechanisms of plasticity*. *Cell Transplant*, 2011. **20**(8): p. 1179-92.
365. Diaz, D., et al., *Long-lasting changes in the anatomy of the olfactory bulb after ionizing irradiation and bone marrow transplantation*. *Neuroscience*, 2011. **173**: p. 190-205.
366. Yardeni, T., et al., *Retro-orbital injections in mice*. *Lab Anim (NY)*, 2011. **40**(5): p. 155-60.
367. Gupta, A.N., et al., *Pharmacological chaperone reshapes the energy landscape for folding and aggregation of the prion protein*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12058.
368. Kocisko, D.A., et al., *A porphyrin increases survival time of mice after intracerebral prion infection*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(2): p. 759-61.
369. Kobayashi, A., et al., *The influence of PRNP polymorphisms on human prion disease susceptibility: an update*. *Acta Neuropathol*, 2015. **130**(2): p. 159-70.
370. Gough, K.C. and B.C. Maddison, *Prion transmission: prion excretion and occurrence in the environment*. *Prion*, 2010. **4**(4): p. 275-82.
371. Bradley, R., *Veterinary research at the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, with special reference to scrapie and bovine spongiform encephalopathy*. *Rev Sci Tech*, 2000. **19**(3): p. 819-30.
372. Houston, T., et al., *Regulation of haem biosynthesis in normoblastic erythropoiesis: role of 5-aminolaevulinic acid synthase and ferrochelatase*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1201**(1): p. 85-93.
373. Collinge, J. and A.R. Clarke, *A general model of prion strains and their pathogenicity*. *Science*, 2007. **318**(5852): p. 930-6.
374. Giles, K., S.H. Olson, and S.B. Prusiner, *Developing Therapeutics for PrP Prion Diseases*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017. **7**(4).
375. Barreca, M.L., et al., *Pharmacological Agents Targeting the Cellular Prion Protein*. *Pathogens*, 2018. **7**(1).
376. Tayebi, M., et al., *Epitope-specific anti-prion antibodies upregulate apolipoprotein E and disrupt membrane cholesterol homeostasis*. *J Gen Virol*, 2010. **91**(Pt 12): p. 3105-15.
377. Minikel, E.V., et al., *Prion protein lowering is a disease-modifying therapy across prion disease stages, strains and endpoints*. *Nucleic Acids Res*, 2020.

378. Adjou, K.T., et al., *Probing the dynamics of prion diseases with amphotericin B*. Trends Microbiol, 1997. **5**(1): p. 27-31.
379. Kawasaki, Y., et al., *Orally administered amyloidophilic compound is effective in prolonging the incubation periods of animals cerebrally infected with prion diseases in a prion strain-dependent manner*. J Virol, 2007. **81**(23): p. 12889-98.
380. Ghaemmaghmi, S., M. Russo, and A.R. Renslo, *Successes and challenges in phenotype-based lead discovery for prion diseases*. J Med Chem, 2014. **57**(16): p. 6919-29.
381. Giles, K., et al., *Different 2-Aminothiazole Therapeutics Produce Distinct Patterns of Scrapie Prion Neuropathology in Mouse Brains*. J Pharmacol Exp Ther, 2015. **355**(1): p. 2-12.
382. Giles, K., et al., *Identification of I137M and other mutations that modulate incubation periods for two human prion strains*. J Virol, 2012. **86**(11): p. 6033-41.
383. Kamatari, Y.O., et al., *Characterizing antiprion compounds based on their binding properties to prion proteins: implications as medical chaperones*. Protein Sci, 2013. **22**(1): p. 22-34.
384. Callies, O. and A. Hernandez Daranas, *Application of isothermal titration calorimetry as a tool to study natural product interactions*. Nat Prod Rep, 2016. **33**(7): p. 881-904.
385. Patching, S.G., *Surface plasmon resonance spectroscopy for characterisation of membrane protein-ligand interactions and its potential for drug discovery*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(1 Pt A): p. 43-55.
386. Miyazaki, Y., et al., *Identification of Alprenolol Hydrochloride as an Anti-prion Compound Using Surface Plasmon Resonance Imaging*. Mol Neurobiol, 2019. **56**(1): p. 367-377.
387. Yasuda, M. and R.J. Desnick, *Murine models of the human porphyrias: Contributions toward understanding disease pathogenesis and the development of new therapies*. Mol Genet Metab, 2019. **128**(3): p. 332-341.
388. Kroll, R.A., E.A. Neuwelt, and E.A. Neuwelt, *Outwitting the Blood-Brain Barrier for Therapeutic Purposes: Osmotic Opening and Other Means*. Neurosurgery, 1998. **42**(5): p. 1083-1099.
389. Pan, G.Y., X.D. Liu, and G.Q. Liu, *Intracarotid infusion of hypertonic mannitol changes permeability of blood-brain barrier to methotrexate in rats*. Acta Pharmacol Sin, 2000. **21**(7): p. 613-6.
390. Brown, R.C., R.D. Egleton, and T.P. Davis, *Mannitol opening of the blood-brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not 86Rb+ or albumin*. Brain Res, 2004. **1014**(1-2): p. 221-7.
391. To-Figueras, J., et al., *Study of the genotype-phenotype relationship in four cases of congenital erythropoietic porphyria*. Blood Cells Mol Dis, 2007. **38**(3): p. 242-6.
392. Miller-Vedam, L. and S. Ghaemmaghmi, *Strain Specificity and Drug Resistance in Anti-Prion Therapy*. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2013. **13**(19): p. 2397-2406.
393. Burke, C.M., et al., *Emergence of prions selectively resistant to combination drug therapy*. PLoS Pathog, 2020. **16**(5): p. e1008581.
394. Kaneko, Y., M. Tamura, and I. Yamazaki, *Formation of porphyrin pi cation radical in zinc-substituted horseradish peroxidase*. Biochemistry, 1980. **19**(25): p. 5795-9.
395. Arsiwala, S., *Idiopathic acquired persistent true partial to total leukonychia*. Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology, 2012. **78**(1).

396. Martinez Peinado, C., et al., *Successful Treatment of Congenital Erythropoietic Porphyria Using Matched Unrelated Hematopoietic Stem Cell Transplantation*. *Pediatric Dermatology*, 2013. **30**(4): p. 484-489.
397. Besnard, C., et al., *Bone Marrow Transplantation in Congenital Erythropoietic Porphyria: Sustained Efficacy but Unexpected Liver Dysfunction*. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 2020. **26**(4): p. 704-711.
398. Bishop, D.F., et al., *Congenital erythropoietic porphyria: characterization of murine models of the severe common (C73R/C73R) and later-onset genotypes*. *Mol Med*, 2011. **17**(7-8): p. 748-56.
399. Mabbott, N.A., *How do PrP(Sc) Prions Spread between Host Species, and within Hosts?* *Pathogens*, 2017. **6**(4).
400. Al-Dybiat, I., et al., *Prion strain-dependent tropism is maintained between spleen and granuloma and relies on lymphofollicular structures*. *Scientific Reports*, 2019. **9**(1).
401. Sigurdson, C.J., et al., *PrP(CWD) in the myenteric plexus, vagosympathetic trunk and endocrine glands of deer with chronic wasting disease*. *J Gen Virol*, 2001. **82**(Pt 10): p. 2327-34.
402. Rodriguez-Otormin, F., et al., *Envisioning the future of polymer therapeutics for brain disorders*. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2019. **11**(1).
403. Córdoba-David, G., et al., *Effective Nephroprotection Against Acute Kidney Injury with a Star-Shaped Polyglutamate-Curcuminoid Conjugate*. *Scientific Reports*, 2020. **10**(1).
404. Kocisko, D.A., et al., *Enhanced antiscrapie effect using combination drug treatment*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006. **50**(10): p. 3447-9.
405. Sim, V.L. and B. Caughey, *Recent advances in prion chemotherapeutics*. *Infect Disord Drug Targets*, 2009. **9**(1): p. 81-91.
406. Klingenstein, R., et al., *Tricyclic antidepressants, quinacrine and a novel, synthetic chimera thereof clear prions by destabilizing detergent-resistant membrane compartments*. *J Neurochem*, 2006. **98**(3): p. 748-59.
407. Valera, E. and E. Masliah, *Combination therapies: The next logical Step for the treatment of synucleinopathies?* *Movement Disorders*, 2016. **31**(2): p. 225-234.
408. Hajj, R., et al., *Combination of acamprosate and baclofen as a promising therapeutic approach for Parkinson's disease*. *Scientific Reports*, 2015. **5**(1).
409. Farlow, M.R., *Utilizing combination therapy in the treatment of Alzheimer's disease*. *Expert Rev Neurother*, 2004. **4**(5): p. 799-808.

**PUBLICACIONES**

Eraña H, Pérez-Castro M.A, **García-Martínez S**, Charco J.M, López-Moreno R, Díaz-Domínguez C.M, Barrio T, González-Miranda E, Castilla J. *A novel, reliable and highly versatile method to evaluate different prion decontamination procedures*. *Frontiers*. In Press.

Eraña H, Charco J.M, González-Miranda E, **García-Martínez S**, López-Moreno R, Pérez-Castro M.A, Díaz-Domínguez C.M, García-Salvador A, Castilla J. *Detection of Pathognomonic Biomarker PrP<sup>Sc</sup> and the Contribution of Cell Free-Amplification Techniques to the Diagnosis of Prion Diseases*. *Biomolecules* 10, 469.2020

Eraña H, Charco JM, Di Bari MA, Díaz-Domínguez CM, López-Moreno R, Vidal E, González-Miranda E, Pérez-Castro MA, **García-Martínez S**, Bravo S, Fernández-Borges N, Geijo M, D'Agostino C, Garrido J, Bian J, König A, Uluca-Yazgi B, Sabate R, Khaychuk V, Vanni I, Telling GC, Heise H, Nonno R, Requena JR, Castilla J. *Development of a new largely scalable in vitro prion propagation method for the production of infectious recombinant prions for high resolution structural studies*. *PLoS Pathogens*. 15, e1008117; 2019

Charco JM, Eraña H, **García-Martínez S**, López-Moreno R, González-Miranda E, Pérez-Castro MÁ, Díaz-Domínguez CM, Castilla J. *Situación actual de las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles*. *Enfermedades raras. Contribuciones a la investigación social y biomédica*. pp. 113 -128. 2019.

Urquiza P, Laín A, Sanz-Parra A, Moreno J, Bernardo-Seisdedos G, Dubus P, González E, Gutiérrez-de-Juan V, **García S**, Eraña H, San Juan I, Macías I, Ben Bdira F, Pluta P, Ortega G, Oyarzábal J, González-Muñiz R, Rodríguez-Cuesta J, Anguita J, Díez E, Blouin JM, de Verneuil H, Mato JM, Richard E, Falcón-Pérez JM, Castilla J, Millet O. *Repurposing ciclopirox as a pharmacological chaperone in a model of congenital erythropoietic porphyria*. *Sci Transl Med*. 10(459), eaat7467; 2018.

Charco JM, Eraña H, Venegas V, **García-Martínez S**, López-Moreno R, González-Miranda E, Pérez-Castro MÁ, Castilla J. *Recombinant PrP and Its Contribution to Research on Transmissible Spongiform Encephalopathies*. *Pathogens*. 6(4), E67; 2017.